

Posttranskriptionelle Regulation des Chemokins CCL5 (RANTES) durch den TAB1-p38 Signalweg

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Christoph Reiner Eckart
aus Kassel

Gießen, 2013

Aus dem
Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. Michael Kracht

Gutachter: Prof. Dr. M. Kracht
Gutachter: Prof. Dr. S. Bellusci

Tag der Disputation: 14.01.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Biologischer Hintergrund	1
1.2	Signaltransduktion der Entzündungsantwort	2
1.3	Signaltransduktion über den MAPKKK-Signalweg	2
1.4	Der p38 MAPK Signalweg	4
1.5	Organisation des Komplexes aus TAK1 und seinen Bindungspartnern TAB1, TAB2 und TAB3	6
1.6	Die biologische Funktion von CCL5 (RANTES)	8
1.7	Transkriptionelle und postranskriptionelle Regulation der Genexpressi- on von CCL5	11
1.7.1	Transkriptionelle Regulation von CCL5	11
1.7.2	Posttranskriptionelle Regulation von CCL5	13
2	Fragestellung	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Verbrauchsmaterial	18
3.2	Geräte	18
3.2.1	Mikroskop	18
3.2.2	Waagen	18
3.2.3	Zellkultur	18
3.2.4	Zentrifugen	18
3.2.5	Verschiedenes	19
3.3	Chemikalien	19
3.4	Lösungen und Puffer	19
3.5	Sonstige Materialien und Kits	20
3.6	Transfektionsreagenzien	21
3.7	Enzyme und Enzympuffer	21

3.8	Plasmide	21
3.9	Oligonukleotide	22
3.10	Zelllinien und Zellkultur	30
3.11	Zellkulturtechnik	31
3.11.1	Allgemein	31
3.11.2	Bestimmung der Zellzahl	32
3.11.3	Transiente Transfektion	32
3.11.4	Stimulation von Zellen	34
3.11.5	Ernten von Zellen	34
3.12	Zellyse	34
3.12.1	Lyse nach R&D	35
3.12.2	Sonifizieren	35
3.12.3	β -Galaktosidase-Lyse	35
3.12.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	36
3.13	Messung von mRNA	37
3.13.1	RNA Präparation	37
3.13.2	RNA Konzentrationsbestimmung	37
3.13.3	RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion)	37
3.13.4	Real-Time PCR	38
3.14	ELISA	39
3.15	Reportergenversuch	40
3.15.1	Allgemein	40
3.15.2	CCL5 Promotor Reportergenversuch	40
3.15.3	CCL5 3'UTR Reportergenversuch	40
3.15.4	Luciferaseassay	41
3.15.5	β -Galaktosidase-Assay	41
3.16	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Etablierung der Versuchsbedingungen	43
4.1.1	Lysebedingung	43
4.1.2	Zelllinie	44
4.1.3	Überstand einfrieren	48
4.1.4	CCL5 Sekretion in Zeitintervallen	49
4.1.5	Transfektionsmethode	50

4.2	Transkriptionelle Regulation des Chemokins CCL5 durch den TAB1-p38 Signalweg	52
4.3	Posttranskriptionelle Regulation des Chemokins CCL5 durch den TAB1-p38 Signalweg	53
4.3.1	Regulation der CCL5 3'UTR in Mef TAB1 Knockout Zellen, rekonstituiert mit TAB1 oder TAB1 Δ S	53
4.3.2	Regulation der CCL5 3'UTR durch TAB1 und TAB1 Δ S in A549 Zellen	56
4.3.3	Regulation der CCL5 3'UTR durch die p38 MAPK in Abhängigkeit von TAB1 in A549 Zellen	59
4.3.4	Einfluss der essentiellen phosphoacceptor sites T180 und Y182 von p38 auf die Stabilisierung der CCL5 3'UTR in Abhängigkeit von TAB1 in A549 Zellen	63
4.3.5	Einfluss von IL-1 auf die Stabilität der CCL5 3'UTR in A549 Zellen	70
4.3.6	Einfluss von IL-1 auf die Stabilisierung der CCL5 3'UTR unter Actinomycin D in A549 Zellen	74
4.3.7	Regulation der CCL5 3'UTR durch TAB1 und TAB1 Δ S unter dem Einfluss von Actinomycin D in A549 Zellen	77
5	Diskussion	81
6	Zusammenfassung	93
7	Summary	95
8	Abkürzungsverzeichnis	97
9	Abbildungsverzeichnis	101
10	Literaturverzeichnis	103
11	Publikation	118
12	Erklärung	138
13	Danksagung	140

1 Einleitung

1.1 Biologischer Hintergrund

Der menschliche Organismus reagiert auf Infektionen und Verletzungen mit einer Entzündungsantwort. Makroskopisch sichtbar sind die von Celsus Aulus und Claudius Galenus beschriebenen charakteristischen Entzündungszeichen calor, rubor, tumor, dolor und functio laesa (Überwärmung, Rötung, Schwellung, Schmerz und eingeschränkte Funktion) [1]. Für die Entzündungsreaktionen sind die Freisetzung von Zytokinen und die Rekrutierung von Leukozyten zu einem großen Teil verantwortlich.

Neben der Abwehr potentiell schädigender Reize und der Einleitung von Reparaturvorgängen sind Entzündungen an verschiedensten pathologischen Zuständen des menschlichen Organismus beteiligt [2]. Asthma, Rheumatoide Arthritis, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Psoriasis und Lupus erythematodes sind einige Erkrankungen, bei denen eine chronische Entzündung zu systemischer und lokaler Destruktion von Zellen und Gewebe führt. Auch bei Morbus Alzheimer, Atherosklerose, ischämischen Herz- und Gehirnerkrankungen und Karzinomen gibt es Auffälligkeiten, die im Zusammenhang mit Entzündungen stehen [3].

Die Entzündungsreaktion wird durch das Immunsystem vermittelt. Zur Freisetzung von Zytokinen und anderen Proteinen der Entzündungsantwort führen mikrobielle Produkte (wie z.B. bakterielle Lipopolysaccharide) und die wichtigen proinflammatorischen Zytokine IL-1 (Interleukin-1) und TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) [2].

Bakterielle Lipopolysaccharide gehören zur Gruppe der PAMPs (pathogen - associated molecular patterns). Zudem gibt es DAMPs (danger-associated molecular patterns). DAMPs sind Gefahrensignale, Zellkomponenten oder endogene Zytokine. DAMPs und PAMPs aktivieren, durch Bindung an TLRs (Toll-like Rezeptoren), Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, Granulozyten, Monozyten, Mastzellen und dendritische Zellen) und führen zur Produktion von IL-1, TNF- α und anderen Mediatoren. IL-1 und TNF- α können jedoch auch spontan freigesetzt werden. Zellen des angeborenen Immunsystems sind die Hauptquelle für die proinflammato-

torischen Zytokine IL-1 und TNF- α , durch die das Entzündungssignal weitergeleitet wird. Durch die Bindung von PAMPs, DAMPs, IL-1 und TNF- α an ihre jeweils spezifischen membranständigen Rezeptoren werden intrazelluläre Signalwege aktiviert. Hauptsignalwege sind die MAPK (mitogen-activated protein kinase) Signalwege und der NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)-Signalweg. Zu den MAPK gehören p38, JNK (c-jun N-terminal kinase) und ERK (extracellular signal-regulated kinase). Die Aktivierung dieser Signalwege führt auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene zur Expression und Freisetzung von sekundären Entzündungsmediatoren, die alle Zeichen einer Entzündung regulieren [3]. Zu den sekundären Entzündungsmediatoren gehört CCL5 (CC-Chemokin Ligand 5)/RANTES (regulated upon activation, normal T expressed, and presumably secreted).

1.2 Signaltransduktion der Entzündungsantwort

Die Bindung von PAMPs und DAMPs an TLRs (Toll-like receptors) der Zelloberfläche führt zur Einleitung einer Entzündungsreaktion. Die endogenen Zytokine IL-1 und TNF halten die Entzündung aufrecht. IL-1 bindet an IL-1 Rezeptoren (IL-1R) und TNF bindet an TNF Rezeptoren (TNFR). Die beginnende lokale Entzündungsantwort wird von IL-1 und TNF durch parakrine, autokrine, juxtakrine und systemische Aktivierung anderer Zelltypen verstärkt, weitergeführt und ausgebreitet. Die proximalen Signalwege der Rezeptoren von IL-1, TNF und TLR münden häufig in die gleichen Signalwege [3]. Die Aktivierung der IL-1, TNF und TL-Rezeptoren führt über verschiedene Proteine [4], [5] durch nicht-degradative Ubiquitinierung zur Ausbildung von Multiproteinkomplexen. Diese zytosolischen Komplexe aktivieren unter anderem die MAPK p38 α [6].

1.3 Signaltransduktion über den MAPKKK-Signalweg

MAPKs (mitogen-activated protein kinases) sind ein zentraler Bestandteil der Entzündungsantwort. Bei Säugetieren sind sie in allen Bereichen der angeborenen und erworbenen Immunantwort beteiligt.

Unterschiedliche vorgelagerte Signale können zu einer Aktivierung von MAPKKKs führen [7]. Verschiedene MAPKKKs (MAP Kinase Kinase Kinasen) aktivieren durch Phosphorylierung MAPKKs (MAP Kinase Kinasen) [8]. MAPKKs aktivieren durch Phosphorylierung MAPKs (MAP Kinasen) (Abbildung 1.1) [7].

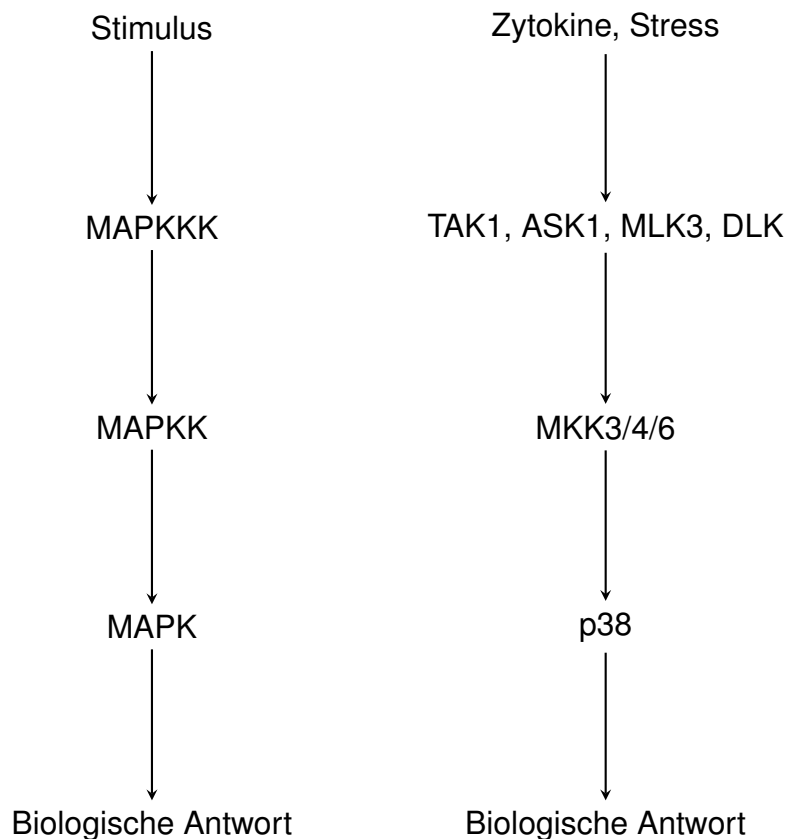


Abbildung 1.1: Mitogenaktivierte Proteinkinase Kaskade. Vereinfachte Darstellung, angelehnt an [9], Figure 1.

MAPKs phosphorylieren ihre Substrate (Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen, Phospholipasen und zytoskelett-assoziierte Proteine) an Serinen und Threoninen [10].

Die drei MAPK Hauptgruppen in Zellen von Säugetieren sind p38 MAP Kinasen, JNK und ERK (extracellular signal-regulated protein kinases). Diese MAP Kinasen werden durch doppelte Phosphorylierung an ihrem Tripeptid Motiv Thr-Xaa-Tyr (Threonin - beliebige Aminosäure - Tyrosin) aktiviert. Das Tripeptid Motiv unterscheidet sich zwischen den MAP Kinase Gruppen (p38 (Thr-Gly-Tyr), JNK (Thr-Pro-Tyr) und ERK (Thr-Glu-Tyr)). Die doppelte Phosphorylierung von Thr und Tyr wird durch eine konservierte Proteinkinase-Kaskade vermittelt. Die p38 MAP Kinase wird durch MKK3 (MAP kinase kinases 3), MKK4 und MKK6 aktiviert. Der JNK Signalweg wird durch MKK4 und MKK7 aktiviert und die ERK MAP Kinasen werden durch MKK1 und MKK2 aktiviert [7]. MKKs werden durch Serin/Threonin Phosphorylierung von MKKKs reguliert [8]. Die MKKKs TAK1 (TGF- β -activated kinase 1) [11], [12], ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) [13], MLK3 (mixed-lineage kinase 3) [14] und DLK (dual

leucine zipper kinase) [15] sind an der Regulation der p38 MAPK Signalweitergabe beteiligt.

Eine hohe Anzahl an MKKKs erlaubt vielen verschiedenen Stimuli in spezifische MAPK Signalwege zu führen. Zunächst kombinieren MKKKs mit unterschiedlichen MKK-MAPK Kombinationen. Spezifität des Signals wird auf Ebene der MKK-MAPK Interaktion generiert [10]. Die spezifische Signaltransduktion der MAP Kinase-Kaskade wird durch Kopplungsstellen und Scaffold Proteine reguliert [16]. Die katalytischen Domänen von MAPKKs koppeln an DVD Motive (konservierte Koppelstelle [17]) von MAPKKs. MAPKKs interagieren mit dem CD (common docking) Motiv von MAPKs [17] und MAPKs binden an die D-Stelle ihres Substrates (z.B. Transkriptionsfaktoren) [16]. Scaffold Proteine generieren Spezifität durch Räumlichkeit. Sie unterstützen die Signaltransduktion über den MAP Kinase Signalweg.

1.4 Der p38 MAPK Signalweg

Die p38 α MAPK wurde zuerst in Monozyten entdeckt, in denen p38 α die Biosynthese der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- α reguliert [18].

In Säugetieren gibt es die vier p38 MAP Kinasen α [19],[20],[21], β [22], γ [23] und δ [24],[25]. Von diesen Isoformen ist p38 α am besten charakterisiert und wird in den meisten Zelltypen exprimiert. P38 α und p38 β können durch die Pyridinyl-Imidazol Verbindung SB203580 und SB202190 inhibiert werden. P38 γ und p38 δ bleiben durch SB203580 und SB202190 vollkommen unbeeinflusst [24].

Neben dem MKKK-MKK Signalweg (siehe Kapitel 1.3) gibt es zwei weitere Mechanismen, die p38 α aktivieren. In einem Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde TAB1 (Transforming growth factor- β -activated protein 1 (TAK1)-binding protein 1) als Bindungspartner der p38 α MAPK identifiziert. TAB1 interagiert nicht mit den anderen p38 Mitgliedern. Die MKK unabhängige Aktivierung wird durch Autophosphorylierung von p38 α nach Interaktion mit TAB1 vermittelt [26]. Im Gegensatz zu der Aktivierung von p38 α durch MKKs führte in Kardiomyozyten die Autophosphorylierung und Aktivierung von p38 α durch TAB1 nicht zu einer Expression von proinflammatorischen Genen, der Genexpression von kardialen Markergenen oder zu Veränderungen in der zellulären Morphologie [27]. TAB1 aktiviert p38 α , aber im Zuge der MKK induzierten p38 Aktivierung kann ein Komplex aus TAB1 und TAK1 mit TAB2 oder TAB3 zu einer negativen Feedbackschleife führen, in der TAB1 durch p38 α phosphoryliert wird und

so die Aktivität von TAK1 begrenzt [11], [28] (zu TAK1 siehe Kapitel 1.5). Ein weiterer von MKK unabhängiger Mechanismus der p38 α Aktivierung wird durch den TCR (T cell antigen receptor) in T-Zellen vermittelt. Der stimulierte TCR aktiviert proximale Tyrosinkinasen, die zu einer Phosphorylierung von p38 α an Tyr323 führen. Diese Phosphorylierung aktiviert p38 α , wodurch das Thr-Gly-Tyr Motiv autophosphoryliert wird [29].

Stärke und Dauer der p38 MAPK Signalweiterleitung bestimmen ihren Effekt. Die Aktivierung von p38 MAPK beginnt innerhalb von Minuten nach Stimulation und wird durch Phosphatasen begrenzt. Die Phosphatasen PP2C (Ser/Thr Phosphatase) und PTP (Tyr Phosphatase) inaktivieren p38 MAPK [30], [31]. Die Phosphatasen MKP-5 und 7 (MAPK-phosphatasen) regulieren JNK und p38 MAPKs [16].

Viele Ziele der p38 MAPK wurden im Zytoplasma und im Zellkern beschrieben, was auf die Kontrolle von mehreren zellulären Funktionen hindeutet. In ruhenden Zellen ist die p38 MAPK im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert. Nach Stimulation der Zelle mit UV-Strahlung zeigt eine Veröffentlichung eine Translokation vom Zytoplasma in die perinukleäre Region [32]. Eine andere Veröffentlichung zeigt, dass durch Natriumarsenit aktiviertes nukleäres p38 in das Zytoplasma exportiert wird [33].

P38 aktiviert im Zellkern und im Zytoplasma verschiedene Proteinkinasen [34] und [35]. Im Zellkern aktiviert p38 unterschiedliche Transkriptionsfaktoren [8] und beeinflusst Transkription, Chromatinremodelling und Translation [8].

Versuche mit dem p38 Inhibitor SB203580 konnten zeigen, dass p38 α an der chemotaktischen Zellmigration beteiligt ist. Ein Beispiel ist die Inhibition der VEGF (vascular endothelial growth factor) vermittelten Endothelzellmigration durch SB203580 [36]. Ein weiteres Beispiel ist die C5a induzierte Neutrophilenmigration, die durch p38 α vermittelt wird [37].

Über die Regulation der Angiogenese durch VEGF sind p38 α und seine Substrate an Tumorstadium beteiligt. P38 unterstützt Entzündung, indem Entzündungszellen zu Orten wandern, an denen Entzündung stattfindet. Aus diesen Gründen sind p38 α und seine Substrate ein mögliches Ziel für zukünftige Medikamente. Da p38 schützende und schädigende Wirkungen in sich vereint, sind p38 nachgeschaltete Proteine wie MK2 (MAPK-activated protein kinase 2) oder davon regulierte Zielgene wie CCL5 möglicherweise besser als p38 und seine vorgeschalteten Proteine als therapeutische Ziele geeignet.

Neben der Regulation der Biosynthese der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- α [18], reguliert p38 α die Produktion von IL-8 als Antwort auf IL-1 oder osmo-

tischen Stress [38] und die Produktion von IL-6 als Antwort auf TNF- α [39]. P38 α reguliert zumindest anteilig die COX-2 (Cyclooxygenase-2), einen weiteren Entzündungsmediator [40]. Die von IL12/IL18 stimulierte IFN- γ (Interferon- γ) Sekretion in TH1-Zellen ist von p38 α abhängig [41].

Neben der transkriptionellen Regulation ist ein weiterer Mechanismus der Genregulation die posttranskriptionelle Regulation. Hierbei beeinflusst p38 α AREs (AU-rich elements) in der 3'UTR (3' untranslatierte Region) verschiedener Gene [42] (Kapitel 1.7).

1.5 Organisation des Komplexes aus TAK1 und seinen Bindungspartnern TAB1, TAB2 und TAB3

TAK1 (Transforming growth factor- β activated kinase-1) ist eine Serin/Threonin Kinase der MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) Familie [8] (Kapitel 1.3). TAK1 wurde 1995 entdeckt [12]. IL-1, TNF, TLRs (Kapitel 1.2) und TGF- β (transforming growth factor- β) [12] regulieren TAK1 über Rezeptoraktivierung. Die Aktivierung von TAK1 führt zur Signalweiterleitung über p38 MAPK, JNK und IKK (I κ B α -Kinase-Komplex). IKK aktiviert NF- κ B (nuclear factor-kappa B). Durch TAK1 werden Zellüberleben, Zelldifferenzierung und Entzündungsantworten über zahlreiche spezifische Transkriptionsfaktoren reguliert.

Die IL-1 Stimulation von Zellen führt zur Aktivierung von TAK1 [43]. IL-1 und TAB1 (TAK1 binding protein 1) aktivieren TAK1 durch Autophosphorylierung an Ser-192 [44]. Außerdem führt die IL-1 Stimulation zur Phosphorylierung an Thr-178 und Thr-184 innerhalb der Kinaseaktivierungsschleife von TAK1. Das ist notwendig für die TAK1 vermittelte IKK/NF- κ B und JNK/AP-1 (activator protein-1) Aktivierung, sowie IL-6 Genexpression [45]. TAB3 kann ebenfalls TAK1 aktivieren. Die Überexpression von TAK1 und seiner regulatorischen Untereinheit TAB1 führt zu einer TAK1 K63 verbundenen Polyubiquitinierung und TAK1 Aktivierung [46]. TAK1 wird ebenfalls über den Typ I TGF- β Rezeptor aktiviert [47]. Die Stimulation von Zellen mit TGF- β führt zu Lys-63 verbundener Polyubiquitinierung von TAK1 und dadurch zu dessen Aktivierung. Diese Polyubiquitinierung von TAK1 führt zur Konformationsänderung, die die Autokinase und Kinaseaktivität von TAK1 verstärken [47]. Nachfolgend werden der p38 und der JNK Signalweg aktiviert [47].

TAB1 (Abbildung 1.2) und TAB2 wurden als Interaktionspartner von TAK1 identifi-

ziert [48]. Wird TAB1 koexprimiert, verstärkt es die Kinaseaktivität von TAK1 [48]. Bei der IL-1 Antwort fungiert TAB2 als Adapter zwischen TAK1 und TRAF6 (TNF receptor associated factor 6), wodurch TAK1 aktiviert wird [43]. Für seine biologische Funktion benötigt TAK1 die Koexpression von TAB1 [48], TAB2 und/oder TAB3 [49].

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass TAB1-defiziente Mefs (mouse embryonic fibroblasts) im Gegensatz zu TAB1 Wildtyp Mefs keine IL-1 induzierbaren p38 MAPK, JNK und NF- κ B Änderungen zeigten [50], [51], [6], [52] und [53], [54] weshalb bis heute kontrovers über die Rolle von TAB1 diskutiert wird.

Das zuerst entdeckte TAK1-bindende Protein war TAB1. TAB1 reguliert direkt TAK1 [48].

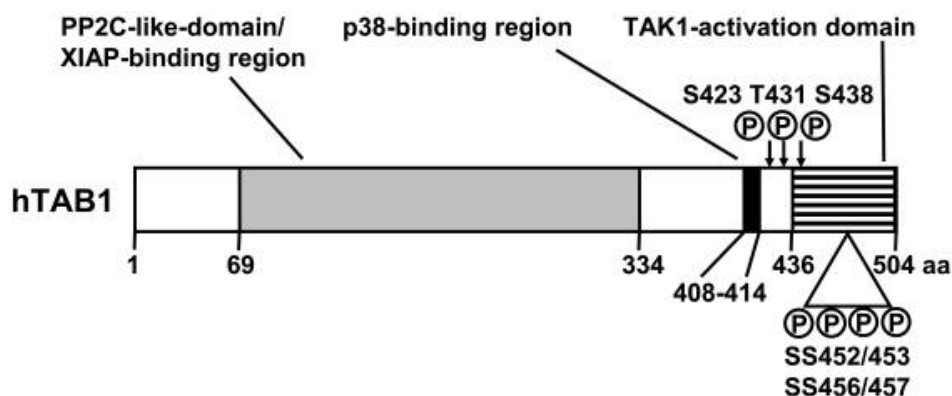


Abbildung 1.2: Aufbau von humanem TAB1. Humanes TAB1 besteht aus 504 Aminosäuren. Es enthält eine N-terminale PP2C (Protein-Phosphatase 2C) -ähnliche- Domäne/XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)-Bindungsregion (dargestellt in grau), eine p38-Bindungsregion (dargestellt in schwarz) und eine TAK1-Bindungs- und Aktivierungsregion (dargestellt in gestreift). Die drei bekannten Phosphorylierungsstellen (S423, T431, S438) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die neu beschriebenen Stellen (SS452/453, SS456/457) sind ebenfalls dargestellt [53]. Modifiziert nach Wolf et al. [53].

Die Aminosäuren 437-504 von TAB1 binden und aktivieren TAK1 [55]. TAB1 wird an Ser423, Thr431 und Ser438 durch p38 α MAPK, ERK1/2 und JNK1/2 phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen sind Teil eines negativen Feedback Mechanismus, der die TAK1 Aktivierung hemmt [11], [56]. Weitere Phosphorylierungsstellen von TAB1 sind die Serine 452-457. Wolf et al. identifizierten SS452/453 und SS456/457 als neue Phosphorylierungsstellen von TAB1, die durch p38 MAPK und durch TAK1 phosphoryliert werden [53].

1.6 Die biologische Funktion von CCL5 (RANTES)

Die Entdeckung und erste Veröffentlichung von RANTES (Abbildung 1.3), welches später als CCL5 bezeichnet wurde, liegt im Jahr 1988. Das CCL5 Gen wird von T-Zellen exprimiert. Es kodiert für ein T-Zell spezifisches Molekül. RANTES ist die Abkürzung für „regulated upon activation, normal T expressed, and presumably secreted“ (reguliert durch (Zell) Aktivierung, gewöhnlich exprimiert von T-Zellen und vermutlich sekretiert). Diese Abkürzung beschrieb beobachtete und erwartete Eigenschaften des entdeckten Gens und des damals erwarteten Produktes. Nach dem Abschneiden eines Signalpeptids besteht CCL5 aus 68 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von etwa 8 kDa. 4 der 68 Aminosäuren sind Cysteine. Es gibt keine Stellen für N-Glykosylierung. Die CCL5 mRNA setzt sich aus einer relativ kurzen kodierenden Region von 275 bp und einer langen 3' untranslatierten Region zusammen, die mehrere Alu Sequenzen enthält [57]. Alu-Sequenzen sind repetitive DNA Sequenzen, die die Genexpression beeinflussen können [58].

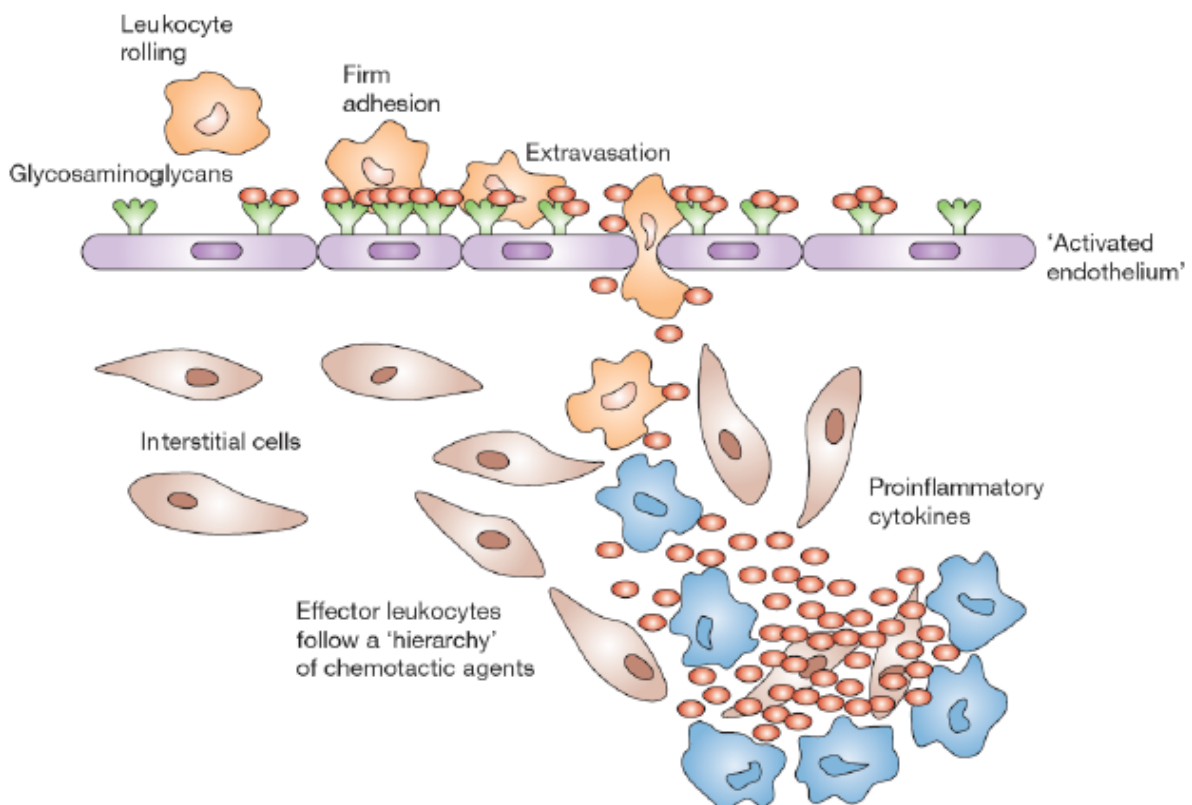
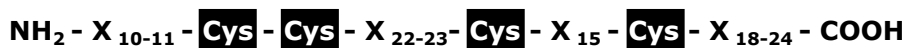


Abbildung 1.3: Biologische Funktion von CCL5 (RANTES). CCL5 (RANTES) (rote Ovale) lockt Immunzellen von der Seite des peripheren Blutes an Entzündungsstellen. Leukozyten rollen entlang des vaskulären Endothels durch Interaktionen mit Selektinen. CCL5 induziert die Expression von Integrinen (z.B. CD11a/CD18 (lymphocyte function-associated antigen-1)), die an der Adhäsion beteiligt sind, sowie von Metalloproteinasen, die an der Bewegung durch das vaskuläre Endothel (Diapedese) und durch das Gewebe beteiligt sind. Die Immunzellen folgen dabei einem chemotaktischen Gradienten zum Ort der Entzündung (Haptotaxis). T-Zellen, aktiviert durch ein spezifisches Antigen, exprimieren CCL5 innerhalb von 3-5 Tagen, wodurch die Immunantwort zeitlich und räumlich verstärkt wird. Modifiziert nach [59].

Des Weiteren wurde CCL5 einer neuen Proteinsuperfamilie, bestehend aus kleinen induzierbar sekretierten Proteinen, den SIS („small inducible secreted proteins“), zugeordnet. SIS Proteine beinhalten vier konservierte Cysteine, von denen zwei benachbart sind und im N-terminalen Bereich des Proteins liegen [60].

Der Ausdruck „RANTES/SIS“ wurde für Proteine humanen Ursprungs benutzt und der Platelet Faktor 4 Superfamilie zugeschrieben. Anhand der Position der ersten zwei Cysteine des konservierten Motivs teilt sich die SIS Superfamilie in einen „C-X-C“ Zweig, sowie einen „C-C“ Zweig. Zwischen den Cysteinen des „C-X-C“ Zweiges befindet sich eine Aminosäure. Die Cysteine des „C-C“ Zweiges liegen benachbart (Abbildung 1.4). Zwischen den vier Cysteinen bilden sich Disulfidbrücken aus, die auf Ebene der Sekundärstruktur zwei Schleifen ergeben [61].

"C - C" Branch



RANTES / SIS Cytokines

Abbildung 1.4: „C-C“ Zweig der Platelet Faktor 4 Superfamilie. PF4 und andere verwandte Moleküle gehören zum „C-X-C“ Zweig (nicht dargestellt). RANTES/SIS Zytokine gehören zum „C-C“ Zweig. Die Cysteine sind in schwarzen Boxen gezeigt und die Anzahl der zwischen ihnen befindlichen Aminosäuren (X) ist in der Unterzahl beschrieben. RANTES/SIS wurde in mehreren Spezies identifiziert. Modifiziert nach [61].

CCL5 und viele andere Chemokine hatten mehrere Bezeichnungen. Zur Vereinheitlichung wurde auf dem Chemokine Keystone Symposium (Keystone, CO, USA) 1999 eine neue Nomenklatur eingeführt. Chemokine wurden nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung numeriert. Ein L für Ligand wurde hinzugefügt (CL, CCL, CXCL und CXXXCL). RANTES wurde der Name CCL5 (CC-Chemokin Ligand 5) zugeordnet [62].

CCL5 induziert durch Interaktion mit den „C-C“ Chemokinrezeptoren CCR1 [62], CCR3 [62], CCR4 [63] und CCR5 [62] Leukozytenmigration [63]. Durch die Expression der Chemokinrezeptoren auf unterschiedlichen Zelltypen beeinflusst CCL5 Eosinophile, Monozyten, aktivierte T-Zellen, natürliche Killerzellen und unreife dendritische Zellen [62]. CCL5 wird von Makrophagen, Mesangiumzellen, Megakaryozyten, einigen Tumoren [64], Epithelzellen [63], T-Lymphozyten, Thrombozyten und synovialen Fibroblasten sekretiert [65].

Astrozyten und astrozytäre Zellen produzieren CCL5 nach Inkubation mit TNF- α oder IL-1 β . IFN- γ verstärkt die TNF- α oder IL-1 β Effekte, kann jedoch die CCL5 Produktion nicht alleine induzieren [66]. NF- κ B ist für die Induktion von CCL5 notwendig [67]. Die IL-1 oder IL-1/IFN- β induzierte CCL5 Expression kann durch I κ B α oder Inhibitoren von p38 oder JNK MAPKs inhibiert werden, aber nicht durch ERK (extracellular signal regulated kinases) Inhibitoren [68].

Das CCL5 Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17q11.2-q12) lokalisiert. Die genetischen Faktoren im Zusammenhang mit bestimmten Krankheiten wurden in Fall-Kontroll und Familienuntersuchungen ermittelt. In der Promotorregion des CCL5 Gens sind vier SNPs (Single Nucleotide Polymorphism = Einzelnukleotid - Polymorphismen) lokalisiert: -28 C/G, -109 C/T, -105 C/T, -403 G/A. Ein weiterer SNP ist in einem Alu-zugehörigen Sequenzbereich (Alu-related repeat area) der 3' untranslatierten Region lokalisiert: 3' 222 T/C. Der Haplotyp ist abhängig von der ethnischen Herkunft [69]. Verschiedene Krankheiten sind mit CCL5 Polymorphismen assoziiert: Atherosklerose, Multiple Sklerose, Lungenerkrankungen (Asthma, pulmonale Sarkoidose), HIV Infektion, Prädisposition für eine HIV Infektion, Diabetes mellitus, Systemischer Lupus Erythematoses (SLE), Vorhersage des Transplantationsoutcomes und das Fortschreiten von Metastasen) [64].

Zusätzlich zu den pathologischen Einflüssen der CCL5 Polymorphismen gibt es zahlreiche Veröffentlichungen zu Einflüssen von CCL5 auf unterschiedliche Erkrankungen [70], unter anderem zu Angina Pectoris [71], Atherosklerose [72], Chondrosarkom Metastasierung [73], Leberfibrose [74], Steatosis hepatis [75], Asthma [76], Dyslipoproteinämie [77], Tuberkulose [78] und allergisch, entzündlichen Hauterkrankungen [79]. Eine erhöhte CCL5 Expression wird mit einer großen Anzahl entzündlicher Erkrankungen in Zusammenhang gebracht [63]. CCL5 verstärkt die Zellmigration von Tumorzellen [70]. Die erhöhte CCL5 Sekretion bei Brusttumoren ist mit einer fortgeschrittenen Erkrankung assoziiert [80]. Chemokine regulieren arterielles Remodelling, wobei die Funktion zwischen Atherogenese und nichtatherogenem arteriellen

Remodelling variiert [81]. CCL5 trägt eine Schlüsselrolle bei verschiedenen vaskulären Entzündungsprozessen wie Glomerulonephritis, Kawasaki Arteriitis und Takayasu Arteriitis. CCL5 mRNA ist in Lungenproben von Patienten mit pulmonal arterieller Hypertonie verglichen mit Kontrollpatienten erhöht [82].

1.7 Transkriptionelle und postranskriptionelle Regulation der Genexpression von CCL5

Die Transkription von DNA in mRNA (messenger RNA) mit Kappe und Poly(A) - Schwanz ist der erste Schritt, der zur Freisetzung von Zytokinen aus Zellen, die an der Entzündungsantwort beteiligt sind, führt [83]. Eine typische eukaryote mRNA besteht aus der kodierenden Sequenz, die translatiert wird, sowie der 5' UTR (untranslatierte Region) und der 3'UTR. 5' und 3'UTR flankieren die kodierende Sequenz. Die RNA Elemente in der 5' und in der 3'UTR regulieren die Translation und die mRNA Stabilität [84]. Die posttranskriptionelle Kontrolle der Zytokinproduktion wird durch die Regulation des Kernexports, die zytoplasmatische Lokalisation, die Translationsinitiation und den mRNA Abbau erreicht [83].

1.7.1 Transkriptionelle Regulation von CCL5

Der CCL5 Promotor (Abbildung 1.5) besteht in seiner vollen Länge aus den Nukleotiden (nt) -974 bis +55.

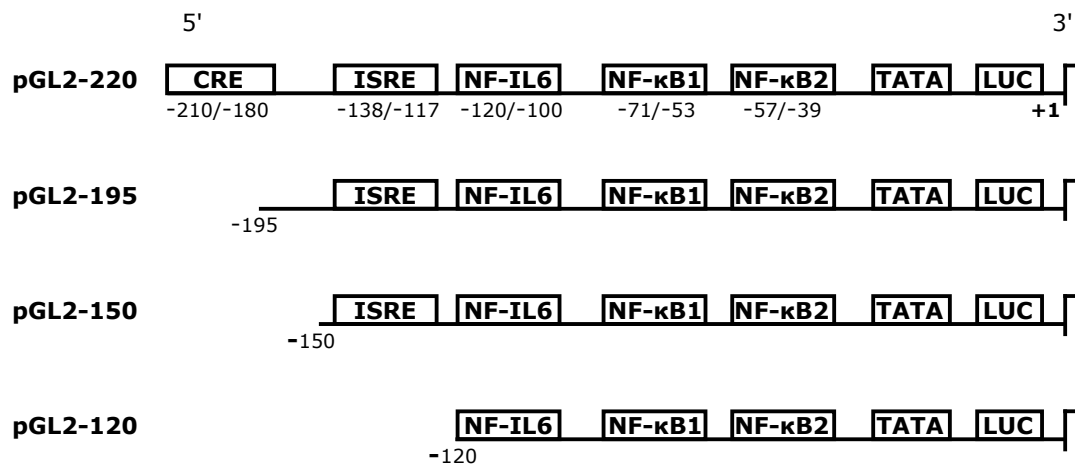


Abbildung 1.5: Schema des CCL5 Promotor-Deletionskonstruktes. Orte der mutmaßlichen Bindungsstellen für CRE, ISRE, NF-IL6 und NF-κB sind gezeigt. Die Numerierung ist relativ zur Stelle der Transkriptionsinitiation. Modifiziert nach [85].

Diese Angaben stehen relativ zu der mRNA Startposition, die mit +1 bezeichnet wird. Durch Deletion- und Mutationsversuche wurden innerhalb des CCL5 Promotors verschiedene Elemente charakterisiert. Durch die reduzierte Aktivität nach Deletions- und Mutationsversuchen konnten Rückschlüsse auf die Funktion bestimmter Bereiche gezogen werden. Für die Transkription von CCL5 werden mehrere cis - regulatorische Elemente benötigt. Dazu gehören das CRE (cyclic AMP-response element), ISRE (interferon-stimulated responsive element), NF-IL6 (nuclear factor of interleukin 6) und NF-κB Bindungsstellen. Deletionen von nt -974 bis -220 hatten keinen Effekt auf die basale oder RSV (respiratory syncytial virus) induzierbare Luziferaseaktivität. Die weitere Deletion bis zum nt -195 reduzierte die basale Promotoraktivität um 30% und die RSV induzierbare Luziferaseaktivität um 60 bis 70%, was eine wichtige Funktion des Bereiches von nt -220 bis -195 bedeutet. Die Deletion bis nt -150 führte zu keiner weiteren Veränderung der Promotoraktivität. Die Deletion bis nt -120 hob die RSV induzierbare Luziferaseaktivität auf [85].

Die Promotorregion von nt -138 bis -117 beinhaltet eine funktionelle ISRE Stelle. Mutationen der ISRE Stelle schwächen die durch IL-1/IFN-β induzierte CCL5 Transkription stark ab [68].

Die NF-κB Stelle ist ebenfalls wichtig für die IL-1/IFN-β induzierbare CCL5 Genexpression, da Mutationen der NF-κB Stelle die durch IL-1/IFN-β induzierte CCL5 Transkription stark abschwächen [68].

AP-1 (activator protein 1) Transkriptionsfaktoren sind ebenfalls an der CCL5 Expression beteiligt. AP-1 Transkriptionsfaktoren werden MAPKs abhängig aktiviert [68]. Ei-

ne CREB (cAMP response element binding protein)/AP-1 Stelle, an der c-Jun bindet, wurde innerhalb des CCL5 Promotors bei -210 bis -180 identifiziert.

1.7.2 Posttranskriptionelle Regulation von CCL5

Ein wichtiger Faktor für die Kinetik der Genexpression ist die Stabilität von mRNA. Ein allgemeines Prinzip der Regulation von mRNA Stabilität ist die Ausbildung von Schleifen. Es gibt die Schleifenbildung zwischen dem 5' und dem 3' Ende einer mRNA und es gibt Haarnadelschleifen innerhalb der 3'UTR einer mRNA. Durch Haarnadelschleifen wird die mRNA langsamer abgebaut [86].

Die Stabilität von mRNA lässt sich in drei Gruppen einteilen. Von TNF aktivierte Gene in Mefs (mouse embryonic 3T3 fibroblasts) lassen sich näherungsweise in drei Gruppen mit unterschiedlichen Induktionskinetiken kategorisieren (Abbildung 1.6).

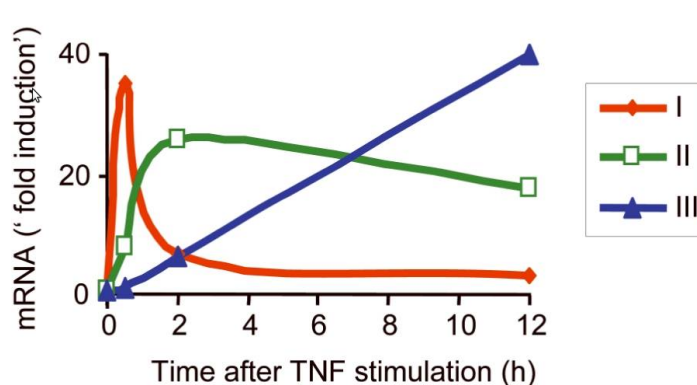


Abbildung 1.6: TNF-aktivierte Gene können in drei verschiedene Kinetikgruppen eingeteilt werden. Die Expressionskinetiken der Gruppen I, II und III sind durch den Höhepunkt der mRNA Expression bei 0,5h (Gruppe I), 2h (Gruppe II) oder 12h (Gruppe III) charakterisiert. Modifiziert nach [87].

In Mefs und humanen primären Hautfibroblasten bleibt der mRNA Anstieg der Gruppe III Gene, wozu CCL5 gehört, auch vier Stunden nach dem Entfernen von TNF auf einem konstant hohen Niveau. Auch CCL5 Protein wird nach dem Entfernen von TNF stabil sekretiert. Die Expression der Gene in Gruppe III wird langsam induziert, die transkriптиerte mRNA ist dann jedoch sehr stabil. Die Halbwertszeit von Gruppe III (wie CCL5) mRNA, gemessen in Experimenten mit Actinomycin D (10 µg/ml), betrug mehr als acht Stunden. Höhere TNF Konzentrationen (10ng/ml im Vergleich zu 1ng/ml) verlängern die Induktion, führen aber nicht zu einer Veränderung der Kinetikmuster der Genexpression. Diese Resultate unterstützen die Ansicht, dass die mRNA Stabilität

ein bestimmender Faktor ist, der Kinetikmuster von TNF-induzierter Genexpression kontrolliert [87].

Es sind verschiedene Mechanismen der posttranskriptionellen Genregulation bekannt. Auf Ebene der 3'UTR sind AU-reiche Elemente (ARE), GU-reiche Elemente (GRE), CU-reiche Elemente (CURE) sowie differentiation control elements (DICE), CA-reiche Elemente (CAREs), iron responsive elements (IREs), selenocysteine insertion sequence elements (SECIS), RNA-binding proteins (RBPs), non-coding RNA (ncRNA) und microRNAs (miRNAs) als regulatorische Elemente der Genregulation bekannt [88]. Der CCL5 3'UTR konnte bisher keines dieser Element der posttranskriptionellen Regulation zugeordnet werden. In der CCL5 3'UTR sind bisher mehrere Alu Sequenzen bekannt [56]. Allgemein sind Alu-Sequenzen repetitive DNA Sequenzen, die die Genexpression beeinflussen können [57]. Genaue Funktionen der Alu Sequenzen in der CCL5 3' UTR sind bisher nicht beschrieben [57], [58].

Im Folgenden Abschnitt werden AREs genauer betrachtet, da in der Literatur Zusammenhänge zwischen AREs und Proteinen, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind, bekannt sind. Viele Zytokine, Chemokine und proinflammatorische Proteine sind Gegenstand des AMD (ARE-mediated decay) [89], [90]. AREs (Cluster aus Adenosin und Uridin-reichen Elementen) wurden in 3' UTRs, unter anderem in der IL-8 3' UTR [91], gefunden [92]. Die Basis von AREs ist das Motiv AUUUA, das Nonamer aus UUAUUUAUU und AU-reiche „Cluster“, die aus verknüpften Pentameren und/oder Nonameren bestehen [93]. Die klassische ARE Sequenz (UUAUUUAUU) wurde in der 3' UTR von TNF [94], [92] und Fos [95], [96] entdeckt. Andere AREs sind ebenso an der Regulation von mRNA Stabilität beteiligt [97], [98]. AREs rekrutieren verschiedene ARE-BPs (ARE-binding proteins), die positiv oder negativ die mRNA Stabilität und/oder Translation regulieren. Beispiele für ARE-BPs sind TTP (Tristetraprolin) [99], BRF1 (Butyrate response factor 1) [100], BRF2 [100] und KSRP (K-homology-type splicing regulatory protein) [101], [102]. TTP bindet AREs von TNF- α und andere Zytokin-mRNA und führt diese ARE enthaltenden Transkripte dem Exosom zu, wo die mRNA deadenyliert und vom 3' zum 5' Ende abgebaut wird [103], [104]. Die ARE enthaltenden Transkripte werden auch P-Bodies (processing bodies) zugeführt. P-bodies sind diskrete zytoplasmatische multiprotein Bereiche, in denen mRNA „entkappt“ und vom 5' zum 3' Ende abgebaut wird [105], [106]. Die Aktivierung von p38-MAPK/MK2 und des JNK Signalwegs führen zu einer Stabilisierung von ARE-mRNA [107], [108], vermittelt durch Bildung von phospho-TTP:14-3-3 Komplexen [109]. Die Aktivierung des p38-MK2 Signalwegs kann aber auch durch Phospho-

rylierung und Inaktivierung von ARE-BPs zur Inhibierung der Translation von ARE enthaltenden Transkripten führen. Dadurch wird der Abbau von ARE enthaltenden Transkripten gefördert [83].

Im Bezug auf die mRNA Stabilität (Abbildung 1.6) ist die Anzahl von AREs in der 3'UTR von mRNA Transkripten der Gruppe I (vier bis zehn AREs) am höchsten und in denen aus Gruppe III (kein ARE bis ein ARE) am niedrigsten. Dazwischen liegt Gruppe II (zwei bis vier AREs). Dies führt zu der Annahme, dass die relative mRNA Stabilität von dem ARE Gehalt bestimmt wird [87].

Weitere Beobachtungen untermauern, dass die 3'UTR einen sehr entscheidenden Einfluss auf die Muster der Genexpression hat. Wird die 3' UTR von Genen der Gruppe III (wie CCL5) mit einem Promotor von Genen der Gruppe I oder II verknüpft, führt dies zu mRNA Expressionsmustern der Gruppe III [87].

Die von AREs vermittelte posttranskriptionelle Kontrolle wird oft von non-AREs im selben Transkript beeinflusst. Non-AREs sind unter anderem CDE (constitutive decay element) [110] und SLDE (stem-loop destabilizing element) [111]. Möglicherweise existieren noch viele andere neue regulatorische Elemente, die in UTRs lokalisiert sind. Mit statistischen Methoden wurden 2772 hoch überrepräsentierte n-mers (short nucleotide sequences) in 3' UTRs identifiziert. Diese n-mers könnten an regulatorischen Funktionen beteiligt sein [112].

Im Bezug auf die IL-1 Entzündungsreaktion ist bekannt, dass p38 α AREs in der 3'UTR verschiedener Gene beeinflusst [42]. P38 α phosphoryliert und aktiviert MK2 und MK3, was zur Stabilisierung von mRNA und Translation von neu erstellten Transkripten führt [113], [114]. MK2 und 3 phosphorylieren und regulieren ARE-bindende Proteine wie TTP und hnRNP A0 (heterogeneous nuclear ribonucleoparticle A0), die die mRNA Stabilität und Translation phosphorylierungsabhängig regulieren [115]. Die Stabilisierung und Translation von neuen mRNA Transkripten wird ebenfalls durch MNK1 (MAPK signal-integrating kinase 1) und MNK2 vermittelt, die durch den p38 MAPK und den ERK Signalweg aktiviert werden. MNK 1 und 2 phosphorylieren und regulieren mRNA bindende Proteine, wie TTP (tristetraproline) [116], HNRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoparticle) Protein A0 [116], HNRNP A1 [116] und KSRP (HNRNP K-homology-type splicing regulatory protein) [3].

In der CCL5 3'UTR gibt es kein ARE. Weiterhin ist im Bezug auf CCL5 bekannt, dass die MAPK Aktivierung an der posttranskriptionellen Regulation der RSV-induzierten CCL5 Genexpression beteiligt ist [117]. Die Halbwertszeit der CCL5 mRNA konnte durch eine RSV Infektion in bronchialen Epithelzellen erhöht werden. [118]. Die Hem-

mung der ERK und der p38 MAPK Aktivierung reduzierte die RSV-induzierte CCL5 mRNA sowie die Proteinsekretion, ohne die CCL5 Transkription oder Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen [117]. Dadurch konnte gezeigt werden, dass p38 für die posttranskriptionelle Regulation von CCL5 wichtig ist.

2 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war, basierend auf bisherigen Versuchsergebnissen unserer Arbeitsgruppe, die Funktion von TAB1 in der Genregulation des Chemokins CCL5 zu untersuchen. Aus der Literatur war bekannt, dass TAB1 eher keine entscheidende Funktion in der „proximalen“ Signaltransduktion von IL-1 reguliert [6], [52]. Daher untersucht diese Arbeit, ob TAB1 einen „distalen“ Schritt der IL-1 Signaltransduktion reguliert. Als Target wurde CCL5 gewählt, da verschiedene Vorbefunde TAB1 und p38 eine wichtige Funktion in der Regulation des Chemokins CCL5 nahelegten. Untersucht wurde daher der Einfluss von TAB1 und p38 auf die transkriptionelle und auf die posttranskriptionelle Genregulation des Chemokins CCL5.

In dieser Arbeit sollte zunächst ein Zellsystem etabliert werden, welches eine hohe IL-1 abhängige CCL5 Genregulation zeigt und sich für transiente Transfektionen eignet. Mit diesem etablierten Zellsystem wurde der Einfluss von TAB1 und p38 auf den CCL5 Promotor durch den Einsatz eines CCL5-Promotor-Luziferasekonstruktes untersucht. Zusätzlich sollte die mRNA Stabilität und die Translationseffizienz der CCL5 mRNA abhängig von der CCL5 3'UTR untersucht werden. Hierzu wurde ein CCL5-3'UTR-Luziferasekonstrukt verwendet und die Luziferase-mRNA sowie die Luziferase-Aktivität bestimmt. Anschließend sollte der Einfluss von TAB1 und seinen Phosphorylierungsstellen 452-457 auf die CCL5 3'UTR untersucht werden. Mit diesen Ansätzen sollte untersucht werden, ob die in den Vorversuchen gezeigte erhöhte CCL5 Sekretion nach Rekonstitution von TAB1 Wildtyp in Mef TAB1 Knockout Zellen transkriptionell oder posttranskriptionell bedingt ist. Im Anschluss daran wurde untersucht, ob die gegenseitige Phosphorylierung von TAB1 an seinem Serincluster durch p38 oder von p38 an seinen Phosphorylierungsstellen T180 und Y182 durch TAB1, die p38 induzierte CCL5 mRNA Stabilisierung beeinflusst. Für diese Versuche wurden die Deletions- und Punktmutanten von TAB1 und p38 verwendet. Somit sollte die biologische Funktion der Proteine TAB1 und p38 tiefergehend charakterisiert werden, um in Zukunft eine zielgerichtete antiinflammatorische Therapie zu ermöglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Einwegmaterialien und Plastikwaren wie Pipettenspitzen, EppendorfgeläÙe oder Falcontubes wurden von den Firmen Sarstedt, Eppendorf, Roth, Omnilab, Brand, Nunc, Greiner Bio-One oder Neolab bezogen.

3.2 GeräÙe

3.2.1 Mikroskop

Leica DMIRE2

3.2.2 Waagen

Fischer FI310

3.2.3 Zellkultur

Wasserbad: Gesellschaft für Labortechnik mbH Typ 1013

Brutschrank: Heraeus Thermo Scientific BBD 6220

Brutschrank: Heraeus Thermo Scientific BB 6220

Sterilwerkbank: Heraeus HeraSafe HS15

Sterilwerkbank: Heraeus HeraSafe HS12

3.2.4 Zentrifugen

Eppendorf Centrifuge 5424

Eppendorf Centrifuge 5415R

Beckman Coulter TJ-25 Centrifuge
Sorvall RC 5C Plus

3.2.5 Verschiedenes

Pipetboy: Integra Biosciences Pipetboy acu
Pipetboy: Integra Biosciences Pipetboy comfort
Vortexer: Janke&Kunkel IKA Labortechnik Typ VF2
IKA-Works MS1 Minishaker
Schüttler: Edmund Bühler GmbH Typ KL2
Schüttler: Dynatech Varishaker-Incubator
ELISA-Reader: Molecular Devices Spectra max Plus 384
PCR-Gerät: Biometra TProfessional Thermocycler
Agilent Technologies NanoDrop Spectrophotometer ND-1000
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System
Eppendorf thermomixer compact
Eppendorf thermomixer 5436
Luminometer: Labsystems Fluoroskan Ascent FL

3.3 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen PAA, Sigma, Merck, Roth, Fluka, Promega, Invitrogen, B. Braun, Applied Biosystems, Qiagen, Serva und Fermentas bezogen (Qualitätsstufe: „p.a.“, „für die Molekularbiologie“ oder „cell culture grade“).

3.4 Lösungen und Puffer

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)

137mmol/l NaCl

2,7mmol/l KCl

4,3mmol/l Na₂HPO₄

1,4mmol/l KH₂PO₄

TE-Puffer

10mmol/l Tris (pH 7,0-8,0)

1mmol/l EDTA

2x HeBS (500ml)

280mM NaCl 8,2g

50mM HEPES 5,95g

1,5mM Na₂HPO₄ 106mg

oder Na₂HPO₄·x12H₂O 269mg

pH=genau 7,05 (nie höher als 7,12. Mit 5M NaOH einstellen)

Schockmedium

DMEM-Vollmedium + 10% Glycerol

2M CaCl₂ (50ml)

14,7g CaCl₂·x12H₂O Sigma

Luziferase-Reagenz

200mmol/l Tricin 30

10,7mmol/l (MgCO₃)₄Mg(OH)₂·x5H₂O

26,7mmol/l MgSO₄

333mmol/l DTT

10mg Coenzym A

5,931mg Na-Luziferin

5,3mmol/l ATP

3.5 Sonstige Materialien und Kits

ELISA:

Human CCL5/RANTES DuoSet - Katalog-Nr.: DY278 R&D Systems, Inc.

Mouse CCL5/RANTES DuoSet - Katalog-Nr.: DY478 R&D Systems, Inc.

NucleoSpin RNA II

Macherey-Nagel GmbH &
Co. KG

Bradford Kit: Protein Assay Dye Reagent

Bio-Rad

Zellkulturmaterial

Greiner Bio-One GmbH

Actinomycin D

Sigma-Aldrich

3.6 Transfektionsreagenzien

Lipofectamine™ LTX with PLUS™ Reagent	Invitrogen
FuGENE® HD	Promega
Attractene	Qiagen

3.7 Enzyme und Enzympuffer

RNase A (10mg/ml, >5000U/mg Protein)	MBI Fermentas
M-MuLV Reverse Transkriptase (200U/ml)	MBI Fermentas
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x), No AmpErase® UNG	Applied Biosystems, Inc.

3.8 Plasmide

pSG-EMPTY	SwitchGear Genomics
pSG-CCL5-3'-UTR	SwitchGear Genomics
pSV-40-β-Gal	Promega
pCS2MT-MYC-TAB1wt	Prof. K. Matsumoto, Nagoya, Japan
pCS2MT-MYC-TAB1ΔS	Prof. Dr. M. Kracht, Gießen, Deutschland
pCMV-FLAG-p38	Prof. Dr. M. Gaestel, Hannover, Deutschland
pCMV-FLAG-p38Y182F	Prof. Dr. M. Kracht, Gießen, Deutschland
pCMV-FLAG-p38T180A	Prof. Dr. M. Kracht, Gießen, Deutschland
pCDNA3.1MKK62E	Prof. Dr. M. Kracht, Gießen, Deutschland
pQBI50fA1-MEKK1Δ-BFP	Prof. Dr. M. Kracht, Gießen, Deutschland
pE-GFP-p65	Prof. Dr. L. Schmitz, Gießen, Deutschland
pCDNA3.1	Invitrogen
pCS3MT	Dr. P. Holland, London, England
pGL2-220-CCL5 Promotor	Allan R. Brasier, MD, Universität Texas

3.9 Oligonukleotide

Sonden

IL-8 Hs00174103_m1

β-Aktin Hs99999903_m1

Customer Sonde

Customer Sonde

<u>Forward Primer Name</u>	<u>Forward Primer Seq.</u>
----------------------------	----------------------------

PGL2_BASIC_F	AGAGCTGTTTTTACGATCCCTTCAG
--------------	---------------------------

<u>Reverse Primer Name</u>	<u>Reverse Primer Seq.</u>
----------------------------	----------------------------

PGL2_BASIC_R	GCGAAGAATGAAAATAGGGTTGGT
--------------	--------------------------

<u>Reporter Name</u>	<u>Reporter Dye</u>	<u>Reporter Sequence</u>
----------------------	---------------------	--------------------------

PGL2_BASIC_M	FAM	ACGCACTTTGAATTTT
--------------	-----	------------------

Customer Sonde

<u>Forward Primer Name</u>	<u>Forward Primer Seq.</u>
----------------------------	----------------------------

PGL4.11LUC_F	GCGCAGCTTGCAAGACTATAAG
--------------	------------------------

<u>Reverse Primer Name</u>	<u>Reverse Primer Seq.</u>
----------------------------	----------------------------

PGL4.11LUC_R	TTGTCGATGAGAGTGCTCTTAGC
--------------	-------------------------

<u>Reporter Name</u>	<u>Reporter Dye</u>	<u>Reporter Sequence</u>
----------------------	---------------------	--------------------------

PGL4.11LUC_M	FAM	CTGGTGCCCACACTAT
--------------	-----	------------------

Plasmide

pSGG_3UTR_empty

Base pairs	4604
RPL10 Promotor	33-307
luc2 reporter gene (synthetic firefly luciferase; includes hPEST)	349-2124
SV40 late poly(A) region	2149-2370
ColE1-derived plasmid replication origin	2695
Synthetic Beta-lactamase (Amp ^r) coding region	3386-4346
Synthetic poly(A) signal/transcriptional pause site	4451-4604
Mlu I <u>ACGCGT</u>	
Bgl II <u>AGATCT</u>	
Rest von Xba I Fse I <u>TCTAGCC</u>	

GGC CTA ACT GGC CGG TAC CTG AGC TCA CGC GT**G** TAC CCG GTC ACC TCT
CTG ATC TGC GCA TGT GCT GGG CTA CGC CCG GGC GCA AGC GCC AAG
AGC GGC TGC GTC TAT GGT CAT GAC GTC TGA CAG AGC GTC CAC CCG TCT
TCG ACA GGA CTC TAT GGT TCT TAC GCG CGC AGA CAG ACC GCC TAT ATA
AGC CAT GCG CAG GCG GAG GAG CGC CTC TTT CCC TTC GGT GTG GTG
AGT AAG CGC AGT TGT CGT CTC TTG CGG TGC CGT TGC TGG TTC TCA CAC
CTT TTA GGT CTG TTC TCG TCT TCC GAG ATC TAA GCT TGG CAA TCC GGT
ACT GTT GGT AAA GCC ACC **ATG** GAA GAT GCC AAA AAC ATT AAG AAG GGC
CCA GCG CCA TTC TAC CCA CTC GAA GAC GGG ACC GCC GGC GAG CAG
CTG CAC AAA GCC ATG AAG CGC TAC GCC CTG GTG CCC GGC ACC ATC GCC
TTT ACC GAC GCA CAT ATC GAG GTG GAC ATT ACC TAC GCC GAG TAC TTC
GAG ATG AGC GTT CGG CTG GCA GAA GCT ATG AAG CGC TAT GGG CTG AAT
ACA AAC CAT CGG ATC GTG GTG TGC AGC GAG AAT AGC TTG CAG TTC TTC
ATG CCC GTG TTG GGT GCC CTG TTC ATC GGT GTG GCT GTG GCC CCA GCT
AAC GAC ATC TAC AAC GAG CGC GAG CTG CTG AAC AGC ATG GGC ATC AGC
CAG CCC ACC GTC GTA TTC GTG AGC AAG AAA GGG CTG CAA AAG ATC CTC
AAC GTG CAA AAG AAG CTA CCG ATC ATA CAA AAG ATC ATC ATC ATG GAT
AGC AAG ACC GAC TAC CAG GGC TTC CAA AGC ATG TAC ACC TTC GTG ACT
TCC CAT TTG CCA CCC GGC TTC AAC GAG TAC GAC TTC GTG CCC GAG AGC
TTC GAC CGG GAC AAA ACC ATC GCC CTG ATC ATG AAC AGT AGT GGC AGT
ACC GGA TTG CCC AAG GGC GTA GCC CTA CCG CAC CGC ACC GCT TGT GTC

CGA TTC AGT CAT GCC CGC GAC CCC ATC TTC GGC AAC CAG ATC ATC CCC
 GAC ACC GCT ATC CTC AGC GTG GTG CCA TTT CAC CAC GGC TTC GGC ATG
 TTC ACC ACG CTG GGC TAC TTG ATC TGC GGC TTT CGG GTC GTG CTC ATG
 TAC CGC TTC GAG GAG GAG CTA TTC TTG CGC AGC TTG CAA GAC TAT AAG
 ATT CAA TCT GCC CTG CTG GTG CCC ACA CTA TTT AGC TTC TTC GCT AAG
 AGC ACT CTC ATC GAC AAG TAC GAC CTA AGC AAC TTG CAC GAG ATC GCC
 AGC GGC GGG GCG CCG CTC AGC AAG GAG GTA GGT GAG GCC GTG GCC
 AAA CGC TTC CAC CTA CCA GGC ATC CGC CAG GGC TAC GGC CTG ACA GAA
 ACA ACC AGC GCC ATT CTG ATC ACC CCC GAA GGG GAC GAC AAG CCT GGC
 GCA GTA GGC AAG GTG GTG CCC TTC TTC GAG GCT AAG GTG GTG GAC
 TTG GAC ACC GGT AAG ACA CTG GGT GTG AAC CAG CGC GGC GAG CTG
 TGC GTC CGT GGC CCC ATG ATC ATG AGC GGC TAC GTT AAC AAC CCC GAG
 GCT ACA AAC GCT CTC ATC GAC AAG GAC GGC TGG CTG CAC AGC GGC GAC
 ATC GCC TAC TGG GAC GAG GAC GAG CAC TTC TTC ATC GTG GAC CGG CTG
 AAG AGC CTG ATC AAA TAC AAG GGC TAC CAG GTA GCC CCA GCC GAA CTG
 GAG AGC ATC CTG CTG CAA CAC CCC AAC ATC TTC GAC GCC GGG GTC GCC
 GGC CTG CCC GAC GAC GAT GCC GGC GAG CTG CCC GCC GCA GTC GTC
 GTG CTG GAA CAC GGT AAA ACC ATG ACC GAG AAG GAG ATC GTG GAC TAT
 GTG GCC AGC CAG GTT ACA ACC GCC AAG AAG CTG CGC GGT GGT GTT
 GTG TTC GTG GAC GAG GTG CCT AAA GGA CTG ACC GGC AAG TTG GAC
 GCC CGC AAG ATC CGC GAG ATT CTC ATT AAG GCC AAG AAG GGC GGC AAG
 ATC GCC GTG AAT TCT CAC GGC TTC CCT CCC GAG GTG GAG GAG CAG GCC
 GCC GGC ACC CTG CCC ATG AGC TGC GCC CAG GAG AGC GGC ATG GAT
 AGA CAC CCT GCT GCT TGC GCC AGC GCC AGG ATC AAC GTC **TAA** GGC
 CGC GAC TCT AGC CGC TTC GAG CAG ACA TGA TAA GAT ACA TTG ATG AGT
 TTG GAC AAA CCA CAA CTA GAA TGC AGT GAA AAA AAT GCT TTA TTT GTG
 AAA TTT GTG ATG CTA TTG CTT TAT TTG TAA CCA TTA TAA GCT GCA ATA AAC
 AAG TTA ACA ACA ACA ATT GCA TTC ATT TTA TGT TTC AGG TTC AGG GGG
 AGG TGT GGG AGG TTT TTT AAA GCA AGT AAA ACC TCT ACA AAT GTG GTA
 AAA TCG ATA AGG ATC CGT CGA CCG ATG CCC TTG AGA GCC TTC AAC CCA
 GTC AGC TCC TTC CGG TGG GCG CGG GGC ATG ACT ATC GTC GCC GCA
 CTT ATG ACT GTC TTC TTT ATC ATG CAA CTC GTA GGA CAG GTG CCG GCA
 GCG CTC TTC CGC TTC CTC GCT CAC TGA CTC GCT GCG CTC GGT CGT TCG
 GCT GCG GCG AGC GGT ATC AGC TCA CTC AAA GGC GGT AAT ACG GTT ATC
 CAC AGA ATC AGG GGA TAA CGC AGG AAA GAA CAT GTG AGC AAA AGG CCA

GCA AAA GGC CAG GAA CCG TAA AAA GGC CGC GTT GCT GGC GTT TTT CCA
TAG GCT CCG CCC CCC TGA CGA GCA TCA CAA AAA TCG ACG CTC AAG TCA
GAG GTG GCG AAA CCC GAC AGG ACT ATA AAG ATA CCA GGC GTT TCC CCC
TGG AAG CTC CCT CGT GCG CTC TCC TGT TCC GAC CCT GCC GCT TAC CGG
ATA CCT GTC CGC CTT TCT CCC TTC GGG AAG CGT GGC GCT TTC TCA TAG
CTC ACG CTG TAG GTA TCT CAG TTC GGT GTA GGT CGT TCG CTC CAA GCT
GGG CTG TGT GCA CGA ACC CCC CGT TCA GCC CGA CCG CTG CGC CTT
ATC CGG TAA CTA TCG TCT TGA GTC CAA CCC GGT AAG ACA CGA CTT ATC
GCC ACT GGC AGC AGC CAC TGG TAA CAG GAT TAG CAG AGC GAG GTA TGT
AGG CGG TGC TAC AGA GTT CTT GAA GTG GTG GCC TAA CTA CGG CTA CAC
TAG AAG AAC AGT ATT TGG TAT CTG CGC TCT GCT GAA GCC AGT TAC CTT
CGG AAA AAG AGT TGG TAG CTC TTG ATC CGG CAA ACA AAC CAC CGC TGG
TAG CGG TGG TTT TTT TGT TTG CAA GCA GCA GAT TAC GCG CAG AAA AAA
AGG ATC TCA AGA AGA TCC TTT GAT CTT TTC TAC GGG GTC TGA CGC TCA
GTG GAA CGA AAA CTC ACG TTA AGG GAT TTT GGT CAT GAG ATT ATC AAA
AAG GAT CTT CAC CTA GAT CCT TTT AAA TTA AAA ATG AAG TTT TAA ATC AAT
CTA AAG TAT ATA TGA GTA AAC TTG GTC TGA CAG CGG CCG CAA ATG CTA
AAC CAC TGC AGT GGT TAC CAG TGC TTG ATC AGT GAG GCA CCG ATC TCA
GCG ATC TGC CTA TTT CGT TCG TCC ATA GTG GCC TGA CTC CCC GTC GTG
TAG ATC ACT ACG ATT CGT GAG GGC TTA CCA TCA GGC CCC AGC GCA GCA
ATG ATG CCG CGA GAG CCG CGT TCA CCG GCC CCC GAT TTG TCA GCA ATG
AAC CAG CCA GCA GGG AGG GCC GAG CGA AGA AGT GGT CCT GCT ACT
TTG TCC GCC TCC ATC CAG TCT ATG AGC TGC TGT CGT GAT GCT AGA GTA
AGA AGT TCG CCA GTG AGT AGT TTC CGA AGA GTT GTG GCC ATT GCT ACT
GGC ATC GTG GTA TCA CGC TCG TCG TTC GGT ATG GCT TCG TTC AAC TCT
GGT TCC CAG CGG TCA AGC CGG GTC ACA TGA TCA CCC ATA TTA TGA AGA
AAT GCA GTC AGC TCC TTA GGG CCT CCG ATC GTT GTC AGA AGT AAG TTG
GCC GCG GTG TTG TCG CTC ATG GTA ATG GCA GCA CTA CAC AAT TCT CTT
ACC GTC ATG CCA TCC GTA AGA TGC TTT TCC GTG ACC GGC GAG TAC TCA
ACC AAG TCG TTT TGT GAG TAG TGT ATA CGG CGA CCA AGC TGC TCT TGC
CCG GCG TCT ATA CGG GAC AAC ACC GCG CCA CAT AGC AGT ACT TTG AAA
GTG CTC ATC ATC GGG AAT CGT TCT TCG GGG CGG AAA GAC TCA AGG ATC
TTG CCG CTA TTG AGA TCC AGT TCG ATA TAG CCC ACT CTT GCA CCC AGT
TGA TCT TCA GCA TCT TTT ACT TTC ACC AGC GTT TCG GGG TGT GCA AAA
ACA GGC AAG CAA AAT GCC GCA AAG AAG GGA ATG AGT GCG ACA CGA AAA

TGT TGG ATG CTC ATA CTC GTC CTT TTT CAA TAT TAT TGA AGC ATT TAT CAG
 GGT TAC TAG TAC GTC TCT CAA GGA TAA GTA AGT AAT ATT AAG GTA CGG
 GAG GTA TTG GAC AGG CCG CAA TAA AAT ATC TTT ATT TTC ATT ACA TCT
 GTG TGT TGG TTT TTT GTG TGA ATC GAT AGT ACT AAC ATA CGC TCT CCA
 TCA AAA CAA AAC GAA ACA AAA CAA ACT AGC AAA ATA GGC TGT CCC CAG
 TGC AAG TGC AGG TGC CAG AAC ATT TCT CT

pSGG_CCL5_3UTR

Base pairs	5575
RPL10 Promoter	33-307
luc2 reporter gene (synthetic firefly luciferase; includes hPEST)	349-2124
CCL5 residual cds + 3'UTR	2146-3073
SV40 late poly(A) region	3120-3341
Mlu I <u>ACGCGT</u>	
Bgl II <u>AGATCT</u>	
Xba I <u>TCTAGA</u>	
Nhe I <u>GCTAGC</u>	
Fse I <u>GGCCGGCC</u>	

GGC CTA ACT GGC CGG TAC CTG AGC TCA CGC GT**G TAC CCG GTC ACC TCT**
CTG ATC TGC GCA TGT GCT GGG CTA CGC CCG GGC GCA AGC GCC AAG
AGC GGC TGC GTC TAT GGT CAT GAC GTC TGA CAG AGC GTC CAC CCG TCT
TCG ACA GGA CTC TAT GGT TCT TAC GCG CGC AGA CAG ACC GCC TAT ATA
AGC CAT GCG CAG GCG GAG GAG CGC CTC TTT CCC TTC GGT GTG GTG
AGT AAG CGC AGT TGT CGT CTC TTG CGG TGC CGT TGC TGG TTC TCA CAC
CTT TTA GGT CTG TTC TCG TCT TCC GAG ATC TAA GCT TGG CAA TCC GGT
 ACT GTT GGT AAA GCC ACC **ATG** GAA GAT GCC AAA AAC ATT AAG AAG GGC
 CCA GCG CCA TTC TAC CCA CTC GAA GAC GGG ACC GCC GGC GAG CAG
 CTG CAC AAA GCC ATG AAG CGC TAC GCC CTG GTG CCC GGC ACC ATC GCC
 TTT ACC GAC GCA CAT ATC GAG GTG GAC ATT ACC TAC GCC GAG TAC TTC
 GAG ATG AGC GTT CGG CTG GCA GAA GCT ATG AAG CGC TAT GGG CTG AAT
 ACA AAC CAT CGG ATC GTG GTG TGC AGC GAG AAT AGC TTG CAG TTC TTC
 ATG CCC GTG TTG GGT GCC CTG TTC ATC GGT GTG GCT GTG GCC CCA GCT
 AAC GAC ATC TAC AAC GAG CGC GAG CTG CTG AAC AGC ATG GGC ATC AGC
 CAG CCC ACC GTC GTA TTC GTG AGC AAG AAA GGG CTG CAA AAG ATC CTC

AAC GTG CAA AAG AAG CTA CCG ATC ATA CAA AAG ATC ATC ATC ATG GAT
AGC AAG ACC GAC TAC CAG GGC TTC CAA AGC ATG TAC ACC TTC GTG ACT
TCC CAT TTG CCA CCC GGC TTC AAC GAG TAC GAC TTC GTG CCC GAG AGC
TTC GAC CGG GAC AAA ACC ATC GCC CTG ATC ATG AAC AGT AGT GGC AGT
ACC GGA TTG CCC AAG GGC GTA GCC CTA CCG CAC CGC ACC GCT TGT GTC
CGA TTC AGT CAT GCC CGC GAC CCC ATC TTC GGC AAC CAG ATC ATC CCC
GAC ACC GCT ATC CTC AGC GTG GTG CCA TTT CAC CAC GGC TTC GGC ATG
TTC ACC ACG CTG GGC TAC TTG ATC TGC GGC TTT CGG GTC GTG CTC ATG
TAC CGC TTC GAG GAG GAG CTA TTC TTG CGC AGC TTG CAA GAC TAT AAG
ATT CAA TCT GCC CTG CTG GTG CCC ACA CTA TTT AGC TTC TTC GCT AAG
AGC ACT CTC ATC GAC AAG TAC GAC CTA AGC AAC TTG CAC GAG ATC GCC
AGC GGC GGG GCG CCG CTC AGC AAG GAG GTA GGT GAG GCC GTG GCC
AAA CGC TTC CAC CTA CCA GGC ATC CGC CAG GGC TAC GGC CTG ACA GAA
ACA ACC AGC GCC ATT CTG ATC ACC CCC GAA GGG GAC GAC AAG CCT GGC
GCA GTA GGC AAG GTG GTG CCC TTC TTC GAG GCT AAG GTG GTG GAC
TTG GAC ACC GGT AAG ACA CTG GGT GTG AAC CAG CGC GGC GAG CTG
TGC GTC CGT GGC CCC ATG ATC ATG AGC GGC TAC GTT AAC AAC CCC GAG
GCT ACA AAC GCT CTC ATC GAC AAG GAC GGC TGG CTG CAC AGC GGC GAC
ATC GCC TAC TGG GAC GAG GAC GAG CAC TTC TTC ATC GTG GAC CGG CTG
AAG AGC CTG ATC AAA TAC AAG GGC TAC CAG GTA GCC CCA GCC GAA CTG
GAG AGC ATC CTG CTG CAA CAC CCC AAC ATC TTC GAC GCC GGG GTC GCC
GGC CTG CCC GAC GAC GAT GCC GGC GAG CTG CCC GCC GCA GTC GTC
GTG CTG GAA CAC GGT AAA ACC ATG ACC GAG AAG GAG ATC GTG GAC TAT
GTG GCC AGC CAG GTT ACA ACC GCC AAG AAG CTG CGC GGT GGT GTT
GTG TTC GTG GAC GAG GTG CCT AAA GGA CTG ACC GGC AAG TTG GAC
GCC CGC AAG ATC CGC GAG ATT CTC ATT AAG GCC AAG AAG GGC GGC AAG
ATC GCC GTG AAT TCT CAC GGC TTC CCT CCC GAG GTG GAG GAG CAG GCC
GCC GGC ACC CTG CCC ATG AGC TGC GCC CAG GAG AGC GGC ATG GAT
AGA CAC CCT GCT GCT TGC GCC AGC GCC AGG ATC AAC GTC **TAA** GGC
CGC GAC TCT AGA GCT AGC AAG AAA TGG GTT CGG GAG TAC ATC AAC TCT
TTG GAG ATG AGC **TAG** GAT GGA GAG TCC TTG AAC CTG AAC TTA CAC AAA
TTT GCC TGT TTC TGC TTG CTC TTG TCC TAG CTT GGG AGG CTT CCC CTC
ACT ATC CTA CCC CAC CCG CTC CTT GAA GGG CCC AGA TTC TAC CAC ACA
GCA GCA GTT ACA AAA ACC TTC CCC AGG CTG GAC GTG GTG GCT CAC GCC
TGT AAT CCC AGC ACT TTG GGA GGC CAA GGT GGG TGG ATC ACT TGA GGT

CAG GAG TTC GAG ACC AGC CTG GCC AAC ATG ATG AAA CCC CAT CTC TAC
TAA AAA TAC AAA AAA TTA GCC GGG CGT GGT AGC GGG CGC CTG TAG TCC
CAG CTA CTC GGG AGG CTG AGG CAG GAG AAT GGC GTG AAC CCG GGA
GGC GGA GCT TGC AGT GAG CCG AGA TCG CGC CAC TGC ACT CCA GCC
TGG GCG ACA GAG CGA GAC TCC GTC TCA AAA AAA AAA AAA AAA AAA
ATA CAA AAA TTA GCC GGG CGT GGT GGC CCA CGC CTG TAA TCC CAG CTA
CTC GGG AGG CTA AGG CAG GAA AAT TGT TTG AAC CCA GGA GGT GGA GGC
TGC AGT GAG CTG AGA TTG TGC CAC TTC ACT CCA GCC TGG GTG ACA AAG
TGA GAC TCC GTC ACA ACA ACA ACA AAA AGC TTC CCC AAC TAA AGC
CTA GAA GAG CTT CTG AGG CGC TGC TTT GTC AAA AGG AAG TCT CTA GGT
TCT GAG CTC TGG CTT TGC CTT GGC TTT GCC AGG GCT CTG TGA CCA GGA
AGG AAG TCA GCA TGC CTC TAG AGG CAA GGA GGG GAG GAA CAC TGC
ACT CTT AAG CTT CCG CCG TCT CAA CCC CTC ACA GGA GCT TAC TGG CAA
ACA TGA AAA ATC GGC TTA CCA TTA AAG TTC TCA ATG CAA CCA TAA AGC
TGA CTC TTG ATT TCC TCC CCT CGA GGG CCG GCC GCT TCG AGC AGA CAT
GAT AAG ATA CAT TGA TGA GTT TGG ACA AAC CAC AAC TAG AAT GCA GTG
AAA AAA ATG CTT TAT TTG TGA AAT TTG TGA TGC TAT TGC TTT ATT TGT AAC
CAT TAT AAG CTG CAA TAA ACA AGT TAA CAA CAA CAA TTG CAT TCA TTT TAT
GTT TCA GGT TCA GGG GGA GGT GTG GGA GGT TTT TTA AAG CAA GTA AAA
CCT CTA CAA ATG TGG TAA AAT CGA TAA GGA TCC GTC GAC CGA TGC CCT
TGA GAG CCT TCA ACC CAG TCA GCT CCT TCC GGT GGG CGC GGG GCA
TGA CTA TCG TCG CCG CAC TTA TGA CTG TCT TCT TTA TCA TGC AAC TCG
TAG GAC AGG TGC CGG CAG CGC TCT TCC GCT TCC TCG CTC ACT GAC TCG
CTG CGC TCG GTC GTT CGG CTG CGG CGA GCG GTA TCA GCT CAC TCA
AAG GCG GTA ATA CGG TTA TCC ACA GAA TCA GGG GAT AAC GCA GGA AAG
AAC ATG TGA GCA AAA GGC CAG CAA AAG GCC AGG AAC CGT AAA AAG GCC
GCG TTG CTG GCG TTT TTC CAT AGG CTC CGC CCC CCT GAC GAG CAT CAC
AAA AAT CGA CGC TCA AGT CAG AGG TGG CGA AAC CCG ACA GGA CTA TAA
AGA TAC CAG GCG TTT CCC CCT GGA AGC TCC CTC GTG CGC TCT CCT GTT
CCG ACC CTG CCG CTT ACC GGA TAC CTG TCC GCC TTT CTC CCT TCG GGA
AGC GTG GCG CTT TCT CAT AGC TCA CGC TGT AGG TAT CTC AGT TCG GTG
TAG GTC GTT CGC TCC AAG CTG GGC TGT GTG CAC GAA CCC CCC GTT CAG
CCC GAC CGC TGC GCC TTA TCC GGT AAC TAT CGT CTT GAG TCC AAC CCG
GTA AGA CAC GAC TTA TCG CCA CTG GCA GCA GCC ACT GGT AAC AGG ATT
AGC AGA GCG AGG TAT GTA GGC GGT GCT ACA GAG TTC TTG AAG TGG TGG

CCT AAC TAC GGC TAC ACT AGA AGA ACA GTA TTT GGT ATC TGC GCT CTG
CTG AAG CCA GTT ACC TTC GGA AAA AGA GTT GGT AGC TCT TGA TCC GGC
AAA CAA ACC ACC GCT GGT AGC GGT GGT TTT TTT GTT TGC AAG CAG CAG
ATT ACG CGC AGA AAA AAA GGA TCT CAA GAA GAT CCT TTG ATC TTT TCT
ACG GGG TCT GAC GCT CAG TGG AAC GAA AAC TCA CGT TAA GGG ATT TTG
GTC ATG AGA TTA TCA AAA AGG ATC TTC ACC TAG ATC CTT TTA AAT TAA AAA
TGA AGT TTT AAA TCA ATC TAA AGT ATA TAT GAG TAA ACT TGG TCT GAC AGC
GGC CGC AAA TGC TAA ACC ACT GCA GTG GTT ACC AGT GCT TGA TCA GTG
AGG CAC CGA TCT CAG CGA TCT GCC TAT TTC GTT CGT CCA TAG TGG CCT
GAC TCC CCG TCG TGT AGA TCA CTA CGA TTC GTG AGG GCT TAC CAT CAG
GCC CCA GCG CAG CAA TGA TGC CGC GAG AGC CGC GTT CAC CGG CCC
CCG ATT TGT CAG CAA TGA ACC AGC CAG CAG GGA GGG CCG AGC GAA
GAA GTG GTC CTG CTA CTT TGT CCG CCT CCA TCC AGT CTA TGA GCT GCT
GTC GTG ATG CTA GAG TAA GAA GTT CGC CAG TGA GTA GTT TCC GAA GAG
TTG TGG CCA TTG CTA CTG GCA TCG TGG TAT CAC GCT CGT CGT TCG GTA
TGG CTT CGT TCA ACT CTG GTT CCC AGC GGT CAA GCC GGG TCA CAT GAT
CAC CCA TAT TAT GAA GAA ATG CAG TCA GCT CCT TAG GGC CTC CGA TCG
TTG TCA GAA GTA AGT TGG CCG CGG TGT TGT CGC TCA TGG TAA TGG CAG
CAC TAC ACA ATT CTC TTA CCG TCA TGC CAT CCG TAA GAT GCT TTT CCG
TGA CCG GCG AGT ACT CAA CCA AGT CGT TTT GTG AGT AGT GTA TAC GGC
GAC CAA GCT GCT CTT GCC CGG CGT CTA TAC GGG ACA ACA CCG CGC CAC
ATA GCA GTA CTT TGA AAG TGC TCA TCA TCG GGA ATC GTT CTT CGG GGC
GGA AAG ACT CAA GGA TCT TGC CGC TAT TGA GAT CCA GTT CGA TAT AGC
CCA CTC TTG CAC CCA GTT GAT CTT CAG CAT CTT TTA CTT TCA CCA GCG
TTT CGG GGT GTG CAA AAA CAG GCA AGC AAA ATG CCG CAA AGA AGG GAA
TGA GTG CGA CAC GAA AAT GTT GGA TGC TCA TAC TCG TCC TTT TTC AAT
ATT ATT GAA GCA TTT ATC AGG GTT ACT AGT ACG TCT CTC AAG GAT AAG
TAA GTA ATA TTA AGG TAC GGG AGG TAT TGG ACA GGC CGC AAT AAA ATA
TCT TTA TTT TCA TTA CAT CTG TGT GTT GGT TTT TTG TGT GAA TCG ATA GTA
CTA ACA TAC GCT CTC CAT CAA AAC AAA ACG AAA CAA AAC AAA CTA GCA
AAA TAG GCT GTC CCC AGT GCA AGT GCA GGT GCC AGA ACA TTT CTC T

3.10 Zelllinien und Zellkultur

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

HEK293IL-1R

Adenovirustransformierte humane embryonale Nierenzelle, stabil transfiziert mit dem IL-1 Rezeptor, Prof. Dr. K. Matsumoto, Nagoya, Japan

Ausgesäte Zelldichte für Transfektionen: 6×10^5 Zellen/ $9,6 \text{ cm}^2$

Transfektionsmethode: Calciumphosphat

Menge an transfizierter DNA: $5 \mu\text{g}$

HeLa (Sakurai)

Humane epitheloide Cervix-Carcinom Zelllinie, von Prof. H. Sakurai, Universität Toyama, Japan

Ausgesäte Zelldichte für Transfektionen: 4×10^5 Zellen/ $9,6 \text{ cm}^2$

Transfektionsmethode: Calciumphosphat

Menge an transfizierter DNA: $5 \mu\text{g}$

shTAK1-HeLa (Sakurai)

Humane epitheloide Cervix-Carcinom Zelllinie, bei der durch stabil transfizierte short hairpin RNA gegen TAK1 die TAK1 mRNA stark reduziert wird.

Ausgesäte Zelldichte für Transfektionen: 4×10^5 Zellen/ $9,6 \text{ cm}^2$

Transfektionsmethode: Calciumphosphat

Menge an transfizierter DNA: $5 \mu\text{g}$

HeLa (Hui Geng)

Humane epitheloide Cervix-Carcinom Zelllinie, von Hui Geng aus der Arbeitsgruppe von Prof. Schmitz, Universität Gießen, Deutschland

Ausgesäte Zelldichte für Transfektionen: 4×10^5 Zellen/ $9,6 \text{ cm}^2$

Transfektionsmethode: Calciumphosphat

Menge an transfizierter DNA: $5 \mu\text{g}$

HeLa tTA

Humane epitheloide Cervix-Carcinom Zelllinie. Stabil transfiziert mit einem Tetrazyklin-induzierbarem transkriptionellem Aktivatorprotein.

Ausgesähte Zelldichte für Transfektionen: 4×10^5 Zellen/ $9,6 \text{ cm}^2$

Transfektionsmethode: Calciumphosphat

Menge an transfizierter DNA: $5 \mu\text{g}$

Mouse embryonic fibroblasts (Mefs)

Embryonale Mausfibroblasten:

TAB1^{-/-}, TAB1^{-/-} rekonstituiert mit TAB1 Wildtyp, TAB1^{-/-} rekonstituiert mit TAB1 Δ S

Ausgesähte Zelldichte für Transfektionen: 1:8

Transfektionsmethode: Calciumphosphat

Menge an transfizierter DNA: $5 \mu\text{g}$

A549

Humane alveoläre Epithelzellen eines Adenokarzinoms

Ausgesähte Zelldichte für Transfektionen: 8×10^5 Zellen/ $9,6 \text{ cm}^2$

Transfektionsmethode: Lipofectamine LTX

Menge an transfizierter DNA: $5 \mu\text{g}$

MRC-5

Humane Lungenfibroblasten

3.11 Zellkulturtechnik

3.11.1 Allgemein

Die verwendeten Zellen wurden in 25 cm^2 , 75 cm^2 oder 175 cm^2 großen Zellkulturflaschen bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO_2 und 95% Luft in Vollmedium kultiviert. Gewöhnlich waren Zellen alle 3-4 Tage konfluent und wurden dann geteilt. Dafür wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 2-5ml trypsinhaltigem PBS etwa 1 Minute inkubiert. Durch Klopfen wurden die Zellen abgelöst, in Vollmedium resuspendiert und ausgesäht oder geteilt.

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) - Vollmedium

Dem DMEM zugesetzt wurden:

10% fetales Kälber Serum

2mM L-Glutamin
100U/ml Penicillin
100µg/ml Streptomycin, GibcoBRL

MRC-5 Zellen wurden in DMEM-Vollmedium mit 1% Nicht-essentiellen Aminosäuren und 1% Natrium-Pyruvat kultiviert.

3.11.2 Bestimmung der Zellzahl

Für das Aussähen oder Teilen von Zellen wurde die Zellzahl bestimmt. Nach Ablösen und Resuspendieren der Zellen in Vollmedium wurden 30µl Zellsuspension 1:1 mit dem Farbstoff Trypanblau versetzt. Tote oder geschädigte Zellen färbten sich blau an, da sie im Gegensatz zu gesunden Zellen Trypanblau nicht ausscheiden können. In der Neubauer-Zählkammer erfolgte die Bestimmung der Zellzahl nach folgender Formel: $\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl pro Großquadrat} \times 2 \cdot 10^4$

3.11.3 Transiente Transfektion

Transiente Transfektionen haben das Ziel fremde DNA in Form eines Plasmids in den Zellkern zu bringen. Im Zellkern soll das Plasmid für einige Tage das gewünschte Gen exprimieren.

Transiente Transfektion mit Calciumphosphat

Einen Tag nach dem Aussähen der Zellen in 2ml Medium pro Loch einer 6-Lochplatte wurden die Zellen transfiziert. Bei der Calciumphosphat-Methode wurde CaCl_2 zu einer phosphathaltigen Pufferlösung, in welche vorher DNA gegeben wurde, pipettiert. Dadurch folgt die Präzipitation von Calciumphosphatkristallen und DNA. Der Niederschlag legte sich auf die Zellen und wird durch Endozytose aufgenommen. Ein Ansatz für ein Loch der 6-Lochplatte bestand aus:

250µl H_2O
+ 225µl 2xHeBS
+ definierte Menge DNA

Pro Ansatz wurden 31,5µl CaCl_2 hinzugegeben und nach kräftigem vortexen 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung wurde pro Loch einer 6-Lochplatte

zu den am Vortag ausgesähten Zellen pipettiert und für 6 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert. Nach diesen 6 Stunden wurden Zellen zweimalig mit 2ml PBS gewaschen und mit 2 ml Vollmedium versetzt. Abhängig von der Dichte wurden Zellen 24 bis 48 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert und dann weiterverarbeitet.

Transiente Transfektion mit Lipofectamine LTX von Invitrogen

Die transiente Transfektion mit Lipofectamine LTX erfolgte nach Herstellerangaben. Am Vortag wurden Zellen ausgesäht. Die Transfektionsreagenzien, verwendete DNA und DMEM ohne Zusätze wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Pro Loch der 6-Lochplatte wurden 500µl DMEM ohne Zusätze in 4ml PS-Tubes vorgelegt und anschließend DNA zugefügt. Dann wurden 3µl PLUS Reagent zugefügt und dieser Ansatz 2 Sekunden schwach gevortext. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Lipofectamine LTX Reagenz schwach gevortext. Für einen Ansatz mit 500µl wurden 3,75µl Lipofectamine LTX Reagenz pipettiert. Das 4ml Röhrchen wurde schwach gevortext und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das bisherige Medium der 6-Lochplatte abgesaugt und durch 1,5ml/Loch DMEM ohne Zusätze ersetzt. Nach der Inkubationszeit wurden 500µl Ansatz/Loch unter leichtem Schwenken der 6-Lochplatte mit einer Pipette in das Loch eingetrofft. Es folgte eine Inkubation von 6 Stunden im Wärmeschrank. Anschließend wurden 200µl/6-Well FCS (fetales Kälberserum) und 20µl/6-Well PSLG (100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 2mM L-Glutamin) zugegeben. Im Anschluss wurden die Zellen bei 37 °C für 18-24 Stunden inkubiert und dann weiterverarbeitet.

Transiente Transfektion mit FuGENE HD von Roche

Am Vortag wurden Zellen ausgesäht. Das FuGENE HD Transfektionsreagenz, die DNA und Medium ohne Zusätze wurden auf Zimmertemperatur erwärmt. Das FuGENE HD Transfektionsreagenz wurde 1 Sekunde gevortext. 100µl Medium ohne Zusätze wurde vorgelegt und 2µg Plasmid DNA zugegeben (0,02 µg/µl). Dieser DNA Komplex wurde gevortext und mit FuGENE HD im Verhältnis 7:2, 5:2 oder 3:2 versetzt (7µl FuGENE HD/2µg DNA, 5µl FuGENE HD/2µg DNA oder 3µl FuGENE HD/2µg DNA). Dieser Ansatz wurde 1-2 Sekunden gevortext und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der 6-Lochplatte abgesaugt und durch 2ml Medium ohne Zusätze ersetzt. 100µl DNA-Komplex/6-Lochplatte wurden pro Loch unter leichtem Schwenken eingetrofft. Nach 6 stündiger Inkubation wur-

den 200µl/6-Well FCS und 20µl/6-Well PSLG zugegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C für 18-24 Stunden inkubiert und dann weiterverarbeitet.

Transiente Transfektion mit Attractene von Qiagen

Am Vortag wurden Zellen ausgesäht. Das Attractene Transfektionsreagenz, die DNA und Medium ohne Zusätze wurden auf Zimmertemperatur erwärmt. 100µl Medium ohne Zusätze wurde vorgelegt und 1,2µg Plasmid DNA zugegeben (0,012 µg/µl). Dieser DNA Komplex wurde gevortext und mit 2,25µl, 4,5µl oder 6,75µl Attractene Transfektionsreagenz versetzt. Dieser Ansatz wurde 1-2 Sekunden gevortext und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der 6-Lochplatte abgesaugt und durch 2ml Medium ohne Zusätze ersetzt. 100µl DNA-Komplex/6-Lochplatte wurden pro Loch unter leichtem Schwenken eingetropft. Nach 6 stündiger Inkubation wurden 200µl/6-Well FCS und 20µl/6-Well PSLG zugegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C für 18-24 Stunden inkubiert und dann weiterverarbeitet.

3.11.4 Stimulation von Zellen

In dieser Arbeit wurden Zellen mit IL-1 α , TNF- α und IFN- γ stimuliert. Es wurde IL-1 α mit 10ng/ml, TNF- α mit 20ng/ml und IFN- γ mit 100ng/ml pro Loch der 6-Lochplatte eingesetzt.

3.11.5 Ernten von Zellen

Das Ernten erfolgte aus 6-Lochplatten, wobei alle Schritte auf Eis ausgeführt wurden. Jedes Loch wurde einmal mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in kaltem PBS abgeschabt und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 4 °C und 500g wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet auf Eis belassen und weiterverarbeitet oder bei -80 °C weggefroren.

3.12 Zelllyse

Zellen wurden für die Konzentrationsbestimmung der intrazellulären Proteine lysiert, um auf die Gesamtproteinmenge zu normieren. Des Weiteren wurden Zellen für die

Messung von intrazellulärem CCL5 lysiert.

3.12.1 Lyse nach R&D

Das geerntete Zellpellet im Reaktionsgefäß wurde mit 200µl/Reaktionsgefäß Lysepuffer versetzt und für 30 Minuten bei 4 °C rotiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 15 Minuten bei 16500g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt das Zelllysate und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Der Lysepuffer bestand aus:

1% NP-40
20 mM Tris-HCl
137 mM NaCl
2 mM EDTA
10 µg/ml Leupeptin
10 µg/ml Pepstatin
10 µg/ml Aprotinin
H₂O
10% Glycerol

3.12.2 Sonifizieren

Das geerntete Zellpellet im Reaktionsgefäß wurde in flüssigem Stickstoff schockgefrostet, wodurch die Zellen platzten. Das schockgefrostete Zellpellet wurde in 750µl PBS aufgetaut, aufgenommen und sonifiziert. Mit dem Sonifikator wurde dreimal 20 Sekunden lang mit jeweils 4 Sekunden Pause sonifiziert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß 15 Minuten bei 4 °C und 16500g zentrifugiert und der Überstand, der das Zelllysate enthält, in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.12.3 β-Galaktosidase-Lyse

Das geerntete Zellpellet im Reaktionsgefäß wurde mit 200µl/Reaktionsgefäß β - Galaktosidase - Lysepuffer versetzt und resuspendiert. Anschließend stand die Probe 15 Minuten auf Eis und wurde dann für 15 Minuten bei 16500g und 4 °C zentrifugiert. Der

Überstand, welcher das Zelllysate enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Der β -Galaktosidase-Lysepuffer besteht aus:

8,5mM KH_2PO_4

91,5mM K_2HPO_4

0,2% Triton X-100

1mg/ml Pepstatin

2,5mM Leupeptin

0,5mM PMSF

1 μ M Microcystin

3.12.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren:

Ein Falcon mit in 10ml Vollmedium gelösten Zellen wurde für 5 Minuten bei 500g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 900 μ l FCS und 100 μ l sterilem DMSO (Dimethylsulfoxid) aufgenommen und zum Vereinzeln der Zellen resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in ein beschriftetes Kryoröhrchen überführt. Über Nacht wurde das Kryoröhrchen bei -80°C in der 4°C vorgekühlten Kryo Box mit Isopropanol gelagert und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen:

Das Kryoröhrchen wurde aus dem flüssigem Stickstoff genommen und im Wasserbad bei 37°C für etwa eine Minute aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml Falcon, in dem 9ml Vollmedium vorgelegt waren, überführt. Das Falcon wurde 5 Minuten bei 500g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml Vollmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in einer T25 Zellkulturflasche ausgesät.

3.13 Messung von mRNA

3.13.1 RNA Präparation

RNA Präparation bezeichnet die Isolierung und Aufreinigung der gesamten RNA aus Zellen. Die RNA Präparation erfolgte mit dem NucleoSpin RNA II Kit nach Herstellerangaben der Firma Macherey & Nagel.

3.13.2 RNA Konzentrationsbestimmung

Nach der RNA Präparation erfolgte die Bestimmung der RNA Konzentration photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260nm in der NanoDrop Messeinheit. Das Absorptionsmaximum der aromatischen Ringe der Nukleinbasen liegt bei 260nm. In der Messeinheit erfolgte die Messung eines Spektrums zwischen 220nm und 330nm. Zwischen den Messwerten bei 260nm und 280nm wird ein Verhältnis gebildet, dass für RNA Messungen optimal bei 2,0 liegen sollte.

3.13.3 RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion)

In der RT-PCR wird die präparierte gesamte RNA durch Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Ein Ansatz von 20µl bestand aus 1µg präparierter RNA in 13,5µl RNase freiem H₂O und 6,5µl Mastermix.

6,5µl Mastermix:

4µl	Buffer M-MuLV-RT
0,5µl	Random Primer Hexamer
0,5µl	dNTP (10mM)
1µl	DTT (0,1M)
0,5µl	M-MuLV-RT

Der Ansatz wird in den Thermocycler mit folgendem Temperaturprofil eingesetzt:

10 Minuten	23 °C
60 Minuten	37 °C
5 Minuten	95 °C
mehrere Stunden möglich	4 °C

Anschließend erfolgte die Weiterverwendung in der Real-Time PCR oder das Wegfrieren bei -20 °C.

3.13.4 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR wurde mit dem Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System durchgeführt. In der Real-Time PCR wurde DNA Menge quantitativ bestimmt (Real-Time qPCR). Das System von Applied Biosystems funktioniert nach dem Prinzip der TaqMan™ PCR. Ein für die zu untersuchende DNA spezifischer Forward Primer und 3'-wärts eine spezifische Sonde binden an ihre spezifische Basensequenzen. Die fluorogene Sonde besteht aus einem Reporter am 5'-Ende und einem Quencher am 3'-Ende. Der Quencher unterdrückt dabei durch Fluoreszenz-Energietransfer (FET) die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs. Trifft nun der am Primer gestartete Transkriptionskomplex auf die Sonde, wird diese verdrängt und es bildet sich eine Y-förmige Sekundärstruktur aus. Dadurch wird die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA Polymerase aktiviert und der nicht-hybridisierte Teil der Sonde hydrolysiert. In Folge dessen entfernen sich Reporter und Quencher räumlich voneinander, der FET wird unterbrochen und der Reporter sendet nach Anregung bei 488nm Fluoreszenz aus, welche gemessen wird. Mit jedem PCR-Zyklus steigt die Fluoreszenz an.

Ein 20µl Real-Time PCR Ansatz besteht aus:

TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x), No AmpErase® UNG	10µl
Nuklease-freiem H ₂ O	7µl
TaqMan Assay on Demand (Primer und Sonde)	1µl
Reverse-Transkriptase-Produkt	2µl

Der Ansatz wurde als Doppelwert in die 96-Lochplatte eingesetzt und der Modus „7500 Fast“ eingestellt. Verwendet wurde folgendes Temperaturprofil:

	Zeit in Sekunden	Temperatur in °C	Zyklen
Polymerase Aktivierung	20	95	1
Denaturierung	3	95	40
Annealing/Elongation	30	60	40

Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode:

1. Normalisierung auf die endogene Kontrolle (β -Aktin oder GUSB (β -Glucuronidase)):

$$\Delta C_T = C_T \text{ Ziel-Gen} - C_T \text{ endogene Kontrolle}$$

2. Normalisierung auf die Kalibrator Probe (üblicherweise: unstimulierte Zellen):

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Probe} - \Delta C_T \text{ Kalibrator}$$

3. Relative Quantifizierung = $2^{-\Delta\Delta C_T}$

3.14 ELISA

Mit dem ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay = enzymgekoppelter Immunsorptions-test) kann Proteinmenge quantitativ bestimmt werden. Im folgenden Absatz wird das Prinzip des sandwich-ELISA zur Messung von CCL5 beschrieben. Zunächst wird der Fänger-Antikörper in eine 96-Well-Platte gegeben und über Nacht inkubiert, so dass er sich am Boden der 96-Well Platte anheftet. Anschließend wird die Probe (aus Lysat oder Überstand) hinzugegeben, wobei das Protein, hier CCL5, spezifisch an die Fänger-Antikörper bindet. Dann wird der biotinylierte CCL5 spezifische Nachweisantikörper hinzugegeben, der an das am Fänger-Antikörper gebundene CCL5 bindet. Im nächsten Schritt wird Meerrettich-Peroxidase zugegeben, die annähernd kovalent an das Biotin des Nachweisantikörpers bindet. Im vorletzten Schritt setzt die gebundene Peroxidase das Substrat (Wasserstoffperoxid) um, wodurch eine Blaufärbung entsteht. Im letzten Schritt stoppt Schwefelsäure die Reaktion und führt zu einem Farbumschlag von Blau nach Gelb. Die Extinktion wird im Photometer bei 450nm gemessen und die Proteinkonzentration berechnet.

Der ELISA wurde nach dem Protokoll des Herstellers R&D Systems durchgeführt. Verwendet wurden der Human CCL5/RANTES DuoSet - Katalog-Nr.: DY278 von R&D Systems, Inc., sowie der mouse CCL5/RANTES DuoSet - Katalog-Nr.: DY478 von R&D Systems, Inc. Als Standard wurde für A549, MRC-5, HEK293IL-1R, und HeLa Zellen CCL5 in Konzentrationen von 1,953 bis 125 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Als Standard wurde für Mef Zellen CCL5 in Konzentrationen von 15,625 bis 2000 $\mu\text{g/ml}$ verwendet.

3.15 Reporter-genversuch

3.15.1 Allgemein

Der eingesetzte Reporter-genversuch misst indirekt über Lumineszenz von Luziferin die Konzentration des Luziferase-Proteins einer Probe. Bei Promotor- und bei 3'UTR-Reporter-genversuchen wird ein Plasmid in Zellen transfiziert, welches das Luziferasegen trägt. Das Luziferasegen wird transkribiert und zum Luziferase-Protein translatiert. Im Luminometer wird zu der Probe Luziferin mit ATP und O₂ gegeben. Die Luziferase setzt Luziferin zu Oxyluziferin um, wobei durch Lumineszenz Licht ausgesendet wird, welches im Luminometer gemessen wird.

In dieser Arbeit wurde ein CCL5-Promotor-Reporter-genkonstrukt und ein CCL5-3'-UTR-Reporter-genkonstrukt eingesetzt. Transkriptionelle Effekte wurden durch Bestimmung der Promotoraktivität im CCL5 Promotor Reporter-genversuch gemessen. Posttranskriptionelle Effekte wurden durch Bestimmung der mRNA Stabilität/ Translationseffizienz im CCL5 3'UTR Reporter-genversuch gemessen.

3.15.2 CCL5 Promotor Reporter-genversuch

In CCL5-Promotor Reporter-genversuchen können Effekte auf die Transkription gemessen werden. Bei CCL5 Promotor Reporter-genversuch werden Plasmide, die ein durch den CCL5-Promotor gesteuertes Luziferasegen tragen, transfiziert. Proteine wie p38 oder TAB1 könnten den CCL5 Promotor beeinflussen, wodurch die Luziferase-mRNA unterschiedlich häufig abgelesen wird. Luziferase-mRNA wird zum Luziferase-Protein translatiert. Die Konzentration an Luziferase-Protein wird im Luziferaseassay indirekt über die Bestimmung der Luziferaseaktivität bestimmt.

3.15.3 CCL5 3'UTR Reporter-genversuch

In CCL5 3'UTR Reporter-genversuchen können Effekte auf posttranskriptioneller Ebene gemessen werden. Die 3'UTR führt unter anderem zu einer veränderten Faltung der CCL5 mRNA (Luziferase-mRNA), wodurch die mRNA Stabilität und die Translationseffizienz beeinflusst werden könnten.

Bei dem CCL5 3'UTR Reporter-genassay werden EMPTY und CCL5 3'UTR Plasmide in einer 6-Lochplatte transient transfiziert. Beide Plasmide tragen den identischen aktiven basalen Promotor, durch den das identische Luziferasegen kontinu-

ierlich exprimiert wird. Der Unterschied zwischen den Vektoren ist der 3'UTR (3'-untranslatierte Region) Bereich, an dessen Stelle entweder die CCL5 3'UTR oder die EMPTY 3'UTR (also keine 3'UTR Region) liegt. Der EMPTY Vektor dient der Normierung, welche einen besonders hohen Stellenwert hat, um spezifische CCL5 3'UTR Effekte zu detektieren.

Nach der Transkription wird die Luziferase-mRNA möglicherweise durch ihre CCL5 3'UTR Region reguliert. Dabei könnten Proteine wie p38 oder TAB1 die CCL5 3'UTR Region beeinflussen, wodurch die Luziferase-mRNA stabilisiert oder destabilisiert werden könnte. Luziferase-mRNA wird zum Luziferase-Protein translatiert. Die Konzentration an Luziferase-Protein wird im Luziferaseassay bestimmt.

3.15.4 Luciferaseassay

Pro Loch einer weißen 96-Loch Platte wurden 20µl Lysat vorgelegt. Die Messung erfolgte als Doppelwert. Zu dem Lysat wurden 100µl Luziferase-Reagenz/Loch der 96-Loch Platte pipettiert und die 96-Loch Platte in das Luminometer gestellt. Nach 5 minütiger Inkubation erfolgte die Messung der Lumineszenz für 10 Sekunden pro Loch.

3.15.5 β -Galaktosidase-Assay

Um Reportergenversuche zu normieren wird die β -Galaktosidase Messung benötigt. Eine Normierung gleicht Unterschiede in der Transfektionseffizienz aus, so dass die Messwerte so wenig wie möglich durch die Transfektionseffizienz beeinflusst werden. Gemessen werden Doppelwerte für jede Probe. Das hier eingesetzte pSV- β -Galaktosidase Plasmid besteht aus einem bakteriellen β -Galaktosidasegen, dass von einem SV40 Promotor kontrolliert wird. Somit wird die β -Galaktosidase konstitutiv exprimiert. Die bakterielle β -Galaktosidase ist hitzestabil, so dass nach der Inkubation bei 50 °C nur exogene (transfizierte) und keine endogene β -Galaktosidase gemessen wird.

Durchführung der β -Galaktosidase Messung:

15µl Zelllysate wurden für 1 Stunde bei 50 °C inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt, gevortext und bei Raumtemperatur weiterverarbeitet. 5µl des Zelllysates wurden pro Loch einer weißen 96-Lochplatte vorgelegt. Hierzu wurden im 10 Sekundenabstand

25µl β-Galaktosidasepuffer-Substratgemisch gegeben. Es folgte die Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Lumineszenz jedes Loches für 10 Sekunden gemessen.

Zusammensetzung des β-Galaktosidasepuffer-Substratgemisches:

25µl Clontech Reaction Buffer Nr. S0917

+ 0,5µl Clontech Reaction Substrate Nr. 2112

3.16 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wird für die Normierung der gemessenen CCL5 Proteinmenge im ELISA auf eine einheitliche Proteinmenge verwendet. Voraussetzung für die Bradfordmessung ist das Funktionsprinzip des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250, der in Roti Quant enthalten ist. Coomassie Brilliant Blue G-250 bindet an Aminosäuren in saurer Lösung. Hierdurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 auf 595 nm, wobei die Farbintensität vom Anteil basischer und aromatischer Aminosäuren abhängt.

Durchführung der Proteinkonzentration nach Bradford:

Zunächst wurde in einer 96-Lochplatte eine Eichreihe und die zu messenden Proben als Dreifachwerte vorgelegt. Für die Eichreihe wurde 100µl BSA-Standard/Loch in Konzentrationen von 0-35 mg/ml verwendet. Von der Probe wurden 100µl Probe/Loch pipettiert. Pro Loch wurden 100µl Bradford Reagenz hinzugefügt. Nach dem Entfernen von Luftblasen erfolgte die Messung der Extinktion mit dem ELISA-Reader bei 598nm.

Bradford Reagenz:

Roti Quant (40% v/v)

ddH₂O (60% v/v)

BSA:

bovines Serumalbumin (Rinderalbumin)

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Versuchsbedingungen

Für die Beantwortung der Fragestellung, ob der TAB1-p38 Signalweg das Chemo-kin CCL5 reguliert, wurden unterschiedliche Eigenschaften verschiedener Zelllinien verglichen, um für weitere Versuche eine geeignete Zelllinie zu etablieren. Die Zelllinie sollte nach IL-1 Stimulation eine ausreichende Menge an CCL5 exprimieren. Die Messwerte von CCL5 auf Ebene der Transkription, Translation und Sekretion sollten reproduzierbar im validen Messbereich liegen. Zudem sollte die Zelllinie eine ausreichende Transfektionseffizienz aufweisen, um in Reporter-Genversuchen valide Werte über dem Hintergrund zu erhalten. Auf Ebene der Transkription erfolgte die Messung von CCL5 mRNA in der Real-Time-PCR. Die Messung von intrazellulärem CCL5 Protein nach der Translation erfolgte nach Zelllyse im ELISA. Sekretiertes CCL5 Protein wurde aus Überstand im ELISA gemessen.

4.1.1 Lysebedingung

Um die translatierte Menge von CCL5 in den Zellen valide zu detektieren, wurden zunächst drei unterschiedliche Lysebedingungen verglichen (siehe Abbildung 4.1).

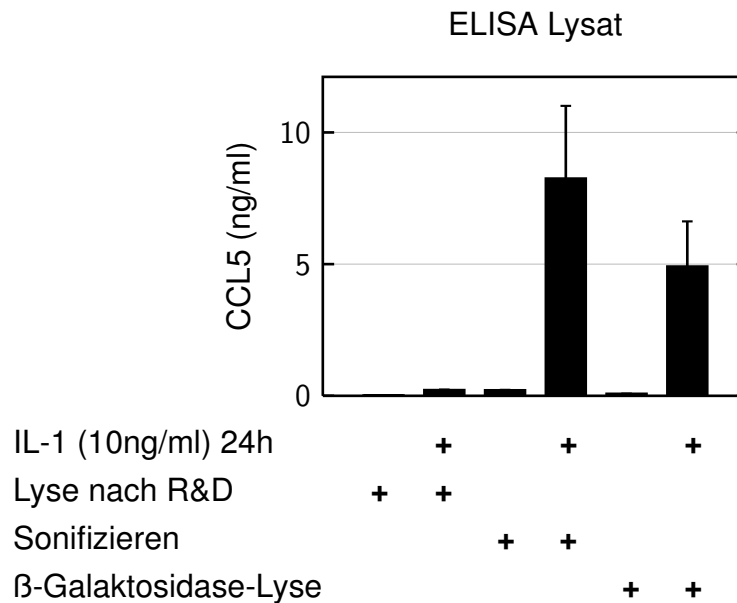


Abbildung 4.1: Vergleichbar hohe CCL5-Konzentrationen bei der β-Galaktosidase-Lyse und bei Sonifizieren im Vergleich zur Lyse nach R&D. A549-Zellen wurden unstimuliert gelassen oder für 24 Stunden mit IL-1 (10ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden anschließend geerntet und ein Zellpellet aus einer T75-Flasche lysiert. Anschließend erfolgte die Messung von CCL5 aus Lysat im ELISA. Das Lysat der Lyse nach R&D und der β-Galaktosidase-Lyse wurde in Verdünnungen von 1:5 und 1:25 eingesetzt. Das Lysat nach Sonifizieren wurde in Verdünnungen von 1:2 und 1:10 eingesetzt. Die CCL5 Konzentrationen sind auf 1mg Gesamtprotein normiert. Der Fehlerbalken (\pm S.E.M.) ergibt sich aus den jeweiligen Verdünnungspaa- ren.

Der Versuch zeigt, dass CCL5 Messungen aus Lysat möglich sind. Der Vergleich der Lysebedingungen zeigt hohe Messwerte für die Lysebedingung Sonifizieren (siehe Material und Methoden). Für Versuche, auf die Bestandteile von Lysepuffern stören- de Einflüsse haben, zeigt dieser Versuch eine sinnvolle Alternative auf. Die Zelllyse durch Sonifizieren schont die zu messenden Proteine, die somit im gut messbaren Bereich verbleiben. Ebenfalls im gut messbaren Bereich liegen die Messwerte der β- Galaktosidase-Lyse (siehe Material und Methoden). Für die weiteren Versuche dieser Arbeit wurde aufgrund technischer Vorteile die β-Galaktosidase-Lyse eingesetzt.

4.1.2 Zelllinie

Verschiedene Zelllinien wurden auf ihre IL-1 und TNF induzierbare CCL5 Protein Ex- pression untersucht. Analysiert wurden HEK293IL-1R, HeLa-Zellen aus verschiede-

nen Laboren, Mef (mouse embryonic fibroblast), MRC-5 und A549 Zellen.

Bei HEK293IL-1R war die basale, die IL-1 und die TNF induzierbar sekretierte CCL5 Menge im unteren Messbereich. Um die sekretierte CCL5 Menge zu erhöhen wurde das Prinzip des Serumentzugs eingesetzt. HEK293IL-1R Zellen reagierten auf den Serumentzug sehr empfindlich. Zusätzlich lag die Konzentration des gemessenen CCL5 bei HEK293IL-1R Zellen, wie im Versuch ohne Serumentzug, unterhalb der Eichgerade. Deshalb waren diese Zellen für weitere Versuche ungeeignet.

Auch bei HeLa Zellen war die basale, die IL-1 und die TNF induzierbar sekretierte CCL5 Menge im unteren Messbereich. Das gemessene CCL5 bei HeLa Zellen konnte durch Serumentzug erhöht werden. Da jedoch auch die basalen CCL5 Konzentrationen erhöht waren, fiel der Anstieg für die IL-1 induzierte CCL5 Sekretion gering aus. Bei anderen HeLa Zellen war die basale CCL5 Konzentrationen bereits ohne Serumentzug erhöht oder sie reagierten nur auf die TNF Stimulation. Für die weiteren Versuche würden HeLa Zellen den Vorteil bieten, dass sie gut mit der Calciumphosphat-Methode zu transfizieren wären. Das beste Ergebnis der HeLa Zellen zeigten HeLa tTA Zellen. Um diese Ansätze weiter zu verfolgen wurden zunächst weitere Versuche mit HeLa tTA Zellen durchgeführt, in denen die IL-1 und TNF induzierte CCL5 Genexpression genauer untersucht wurde. Nach IL-1 und TNF Stimulation zeigten HeLa tTA einen Anstieg der CCL5 mRNA Expression, Translation und Sekretion. Dieser Anstieg fiel für TNF stärker aus. Da der Focus dieser Arbeit auf IL-1 induzierten Effekten liegt, wurde im nächsten Versuch IL-1 verwendet, obwohl der Anstieg von CCL5 in HeLa tTA nach TNF Stimulation größer war. Zur genaueren Analyse der CCL5 Expression in HeLa tTA wurde eine IL-1 Kinetik erstellt, die den zeitlichen Ablauf der CCL5 Expression darstellt (Abbildung 4.2).

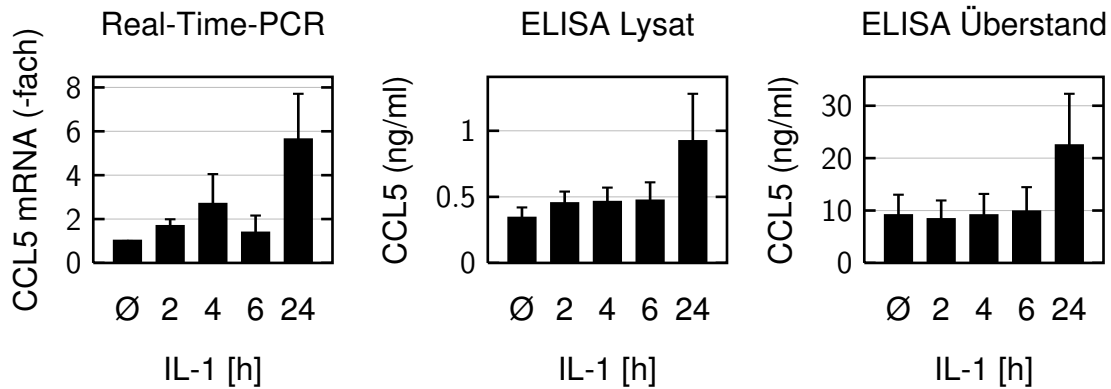


Abbildung 4.2: HeLa tTA zeigen nach IL-1 Stimulation einen leichten Anstieg der CCL5 mRNA Expression, Translation und Sekretion. HeLa tTA Zellen wurden unstimuliert gelassen oder für 2, 4, 6 oder 24 Stunden mit IL-1 (10ng/ml) stimuliert. Der Überstand wurde in einer Verdünnung von 1:5 und 1:25 in den ELISA eingesetzt und die CCL5 Proteinmenge bestimmt. Die Zellen wurden geerntet und ein Zellpellet aus einem 6-Well mit β -Galaktosidase-Puffer lysiert. Das Lysat wurde in einer Verdünnung von 1:5 und 1:25 in den ELISA eingesetzt und die CCL5 Proteinmenge bestimmt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde im Lysat mittels Bradford bestimmt und die CCL5 Konzentration auf 1 mg Gesamtproteinmenge normiert. Der Mittelwert und SEM des ELISA resultieren aus drei unabhängigen Experimenten. Der Mittelwert und SEM der Real-Time-PCR resultieren aus 2 unabhängigen Experimenten.

HeLa tTA zeigen nur einen leichten Anstieg der CCL5 mRNA und des CCL5 Proteins in Lysat und Überstand. Die Kinetik deutet auf eine späte IL-1 Antwort hin. Zusammenfassend waren HeLa tTA, sowie die vorher getesteten HeLa Zellen für die weiteren Versuche ungeeignet, da die IL-1 Stimulation nur zu geringer CCL5 Freisetzung führte.

Im Kontext mit den Eingangsexperimenten von Wolf et al. [53] wurden ebenfalls Mef Zellen auf ihre IL-1 induzierbare CCL5 Produktion analysiert. Es wurde eine IL-1 Kinetik mit Mef TAB1wt Zellen, mit Mef TAB1 Knockout Zellen und mit Mef TAB1 Knockout Zellen mit rekonstituiertem TAB1wt durchgeführt. In zwei unabhängigen Experimenten fehlte auf mRNA und auf Proteinebene die IL-1 induzierbare CCL5 Expression. Die 2011 von Wolf et al. [53] gezeigte Stimulierbarkeit konnte nicht reproduziert werden. Daher wiesen diese TAB1 Mefs eine variable IL-1 induzierte Geninduktion auf und waren für die Folgeexperimente nicht brauchbar.

Eine weitere Zelllinie, die auf ihre IL-1 induzierte CCL5 Genexpression untersucht wurde waren MRC-5 Zellen. MRC-5 Zellen stammen aus humanem Lungengewebe. In der, wie mit HeLa tTA Zellen, durchgeführten IL-1 Kinetik zeigen MRC-5 Zellen

eine sehr gute CCL5 Antwort, bei niedrigen Absolutwerten knapp überhalb des unteren Messbereiches. In der Zellkultur wuchsen MRC-5 Zellen äußerst langsam. Aus diesen Gründen waren ebenfalls diese Zellen für spätere Versuche der Fragestellung nicht geeignet.

Die im Anschluss daran getestete Zelllinie war A549. A549 Zellen sind humane alveoläre Epithelzellen eines Adenokarzinom. Auch bei diesen Zellen wurde die IL-1 induzierbare CCL5 Genexpression untersucht. Das Ergebnis der Sekretion von CCL5 nach IL-1 oder TNF Stimulation zeigt Abbildung 4.3.

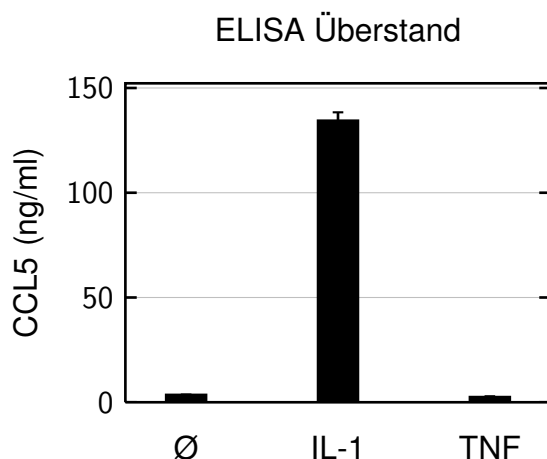


Abbildung 4.3: A549 Zellen zeigen eine starke IL-1 abhängige CCL5 Sekretion, aber keine TNF abhängige CCL5 Sekretion. A549 Zellen wurden unstimuliert gelassen oder für 24 Stunden mit IL-1 (10ng/ml) oder TNF- α (20ng/ml) stimuliert. Anschließend erfolgte die Messung von sekretiertem CCL5 aus Überstand im ELISA. Der Überstand wurde in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt. Die CCL5 Konzentrationen sind auf $1 \cdot 10^7$ Zellen normiert. Der Fehlerbalken (\pm S.E.M.) ergibt sich aus einem technischen Replikat.

A549 Zellen zeigten eine 38-fache Steigerung der CCL5 Sekretion nach IL-1 Stimulation. Nach TNF Stimulation zeigte sich kein Anstieg von CCL5. Auf diesen Versuch aufbauend wurde mit A549 Zellen eine IL-1 Kinetik erstellt (Abbildung 4.4).

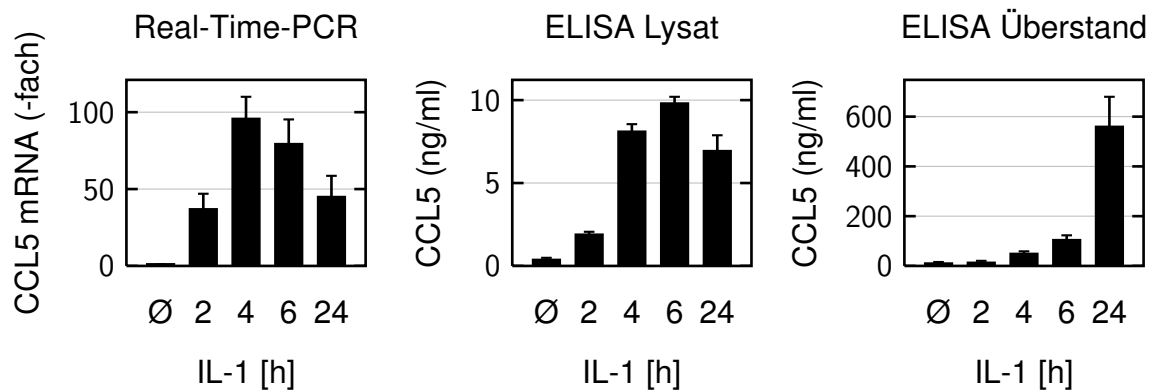


Abbildung 4.4: A549 Zellen zeigen nach IL-1 Stimulation eine starke CCL5 Genexpression. A549 Zellen wurden unstimuliert gelassen oder für 2, 4, 6 oder 24 Stunden mit IL-1 (10ng/ml) stimuliert. Der Überstand wurde in den ELISA eingesetzt und die CCL5 Proteinmenge bestimmt. Die Zellen wurden geerntet und ein Zellpellet aus einem 6-Well mit β -Galaktosidase-Puffer lysiert. Das Lysat wurde in den ELISA eingesetzt und die CCL5 Proteinmenge bestimmt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde im Lysat mittels Bradford bestimmt und die CCL5 Konzentration auf 1 mg Gesamtproteinmenge normiert. Dargestellt sind die Mittelwert und der SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

Der zeitliche Verlauf der CCL5 mRNA ähnelt dem des CCL5 Proteins im Lysats. Die CCL5 mRNA und das CCL5 Protein im Lysat steigen zunächst stark an und fallen anschließend ab. Bei der mRNA ist im Verlauf über 24 Stunden der Höhepunkt bei 4 Stunden mit nachfolgendem Abfall. Im Lysat ist der Höhepunkt bei 6 Stunden mit nachfolgendem leichten Abfall. Im Überstand steigt die CCL5 Menge über den Zeitraum von 24 Stunden leicht exponentiell an. Diese Verläufe und Absolutmengen zeigen, dass CCL5 ein überwiegend sezerniertes Protein ist. Insgesamt zeigten A549 sehr gut reproduzierbar eine hervorragende CCL5 Expression nach IL-1 Stimulation. Im Vergleich der hier untersuchten Zelllinien sind A549 Zellen die am Besten geeignete Zelllinie für die weiteren Versuche.

4.1.3 Überstand einfrieren

Um für spätere Experimente CCL5 aus weggefrorenem Überstand im ELISA zu bestimmen, wurde getestet, ob es, im Vergleich zu frisch eingesetztem Überstand, zu erniedrigten Werten bei Versuchen aus weggefrorenen Proben kommt (Abbildung 4.5).

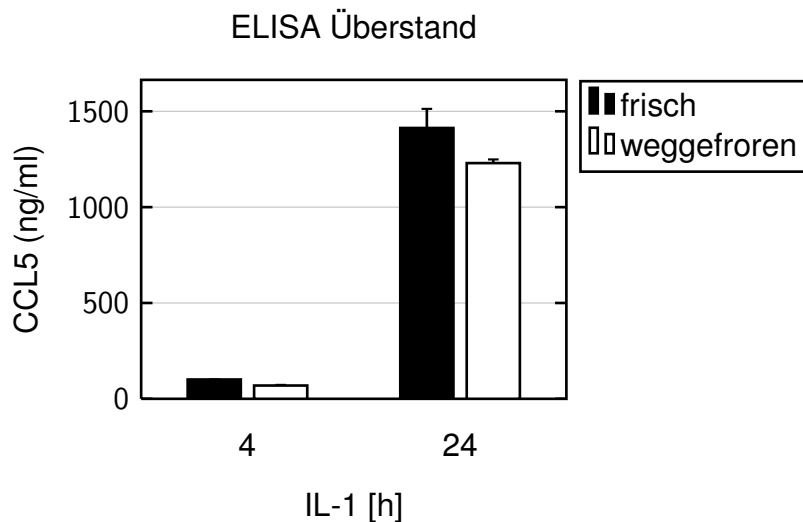


Abbildung 4.5: CCL5 aus A549 Überstand nach Wegfrieren und Auftauen näherungsweise unverändert. Es wurden A549 Zellen unstimuliert gelassen oder für 4 oder 24 Stunden mit IL-1 (10ng/ml) stimuliert. Der Überstand wurde in einer Verdünnung von 1:15 in den ELISA eingesetzt und die CCL5 Proteinmenge bestimmt. Der restliche Überstand wurde bei -20°C weggefroren. 13 Tage später wurde der Überstand aufgetaut und der 4 und der 24 Stunden Überstand in einer Verdünnung von 1:15 in den ELISA eingesetzt und die CCL5 Proteinmenge bestimmt. Es wurde auf 1mg Gesamtprotein normiert. Der Fehlerbalken (\pm S.E.M.) ergibt sich aus einem technischen Replikat.

Gezeigt sind hier die Ergebnisse aus zwei ELISA Versuchen. Der ELISA wurde zunächst aus frisch geerntetem Überstand durchgeführt und anschließend weggefroren. 13 Tage später wurde dieser Überstand aufgetaut und der ELISA mit der identischen Verdünnung von 1:15 erneut durchgeführt. Die gemessenen Werte weichen nur sehr leicht voneinander ab, so dass für nachfolgende Versuche, bei dem Überstand weggefroren und aufgetaut werden muss, vernachlässigbare Abweichungen in den gemessenen CCL5 Werten erwartet werden können.

4.1.4 CCL5 Sekretion in Zeitintervallen

Als nächstes wurde überprüft, ob auch eine einmalige Stimulation mit IL-1 über 2 Stunden mit anschließendem Mediumwechsel zu einer dauerhaften CCL5 Sekretion über 24 Stunden führt (Abbildung 4.6).

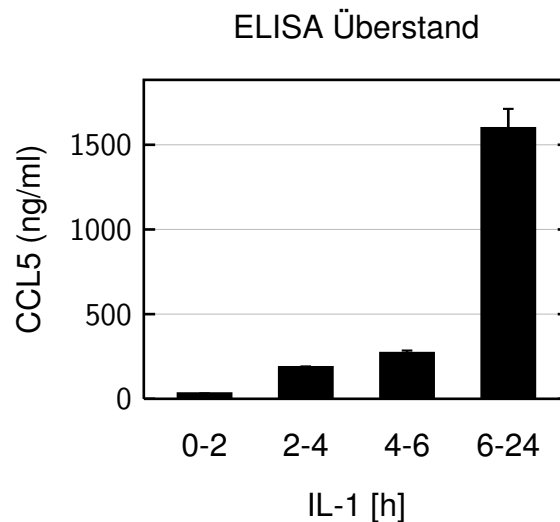


Abbildung 4.6: Stärkster Anstieg der CCL5 Sekretion bei A549 Zellen zwischen 2 und 4 Stunden nach IL-1 Stimulation. Bei A549 Zellen wurde zum Zeitpunkt 0 Überstand abgenommen und das Medium erneuert. Anschließend wurde mit IL-1 (10ng/ml) stimuliert. Der Überstand wurde nach 2, 4, 6 und 24 Stunden abgenommen und weggefroren, sowie jeweils das Zellmedium ohne erneute Zugabe von IL-1 erneuert. Der Überstand wurde in einer Verdünnung von 1:50 in den ELISA eingesetzt und die CCL5 Proteinmenge bestimmt. Die Zellzahl im 6-Well wurde mittels zählen im Mikroskop bestimmt und die CCL5 Konzentration auf $1 \cdot 10^7$ Zellen normiert. Der Fehlerbalken (\pm S.E.M.) ergibt sich aus einem technischen Replikat.

Ausschließlich im Zeitintervall von 0 bis 2 Stunden wurden die Zellen mit IL-1 stimuliert. Im Zeitintervall von 0 bis 2 Stunden findet eine sehr geringe Freisetzung von CCL5 statt. Im Zeitintervall von 2 bis 4 Stunden und von 4 bis 6 Stunden findet eine starke Freisetzung statt. Von 6 bis 24 Stunden findet weiterhin eine dauerhafte CCL5 Freisetzung statt. Zu beachten ist, dass die IL-1 Stimulation nur im Zeitraum von 0 bis 2 Stunden stattfand. Trotzdem kommt es zu einer dauerhaften CCL5 Freisetzung. Dieses Ergebnis korreliert mit Ergebnissen aus der Literatur, in denen CCL5 zu den spät sekretierten Chemokinen gezählt wird [87].

4.1.5 Transfektionsmethode

In späteren Versuchen sollen posttranskriptionelle Effekte über die Transfektion eines Luziferase CCL5-3'UTR Konstruktes, und mögliche Einflüsse darauf von p38 oder TAB1, gemessen werden. Um auch kleine Unterschiede reproduzierbar messen zu können ist eine hohe Transfektionseffizienz erforderlich. Dazu wurden verschiede-

ne Transfektionsmethoden in A549 Zellen miteinander verglichen. Transfektionen mit Calciumphosphat, FuGENE HD, Attractene und Lipofectamine LTX wurden mit Fokus auf ihre erzielte Transfektionseffizienz in A549 Zellen untersucht. Das Prinzip der Calciumphosphatmethode ist im Kapitel Material und Methoden beschrieben. FuGENE HD, Attractene und Lipofectamine LTX sind lipidbasierte Transfektionsmethoden. Die Lipide bilden Komplexe mit DNA und formen sich zu Liposomen. Die Liposomen fusionieren mit der Zellmembran und die DNA wird aufgenommen.

Ein erster Eindruck über die Transfektionseffizienzen ergab sich nach der Transfektion von BFP-MEKK1 (mitogen-activated protein kinase kinase 1) und anschließender Fluoreszenzuntersuchung des blau-fluoreszierenden Proteins. Die meisten blau-fluoreszierenden Zellen in A549 zeigten sich bei der Transfektion mit Lipofectamine LTX, die wenigsten bei der Transfektion mit Calciumphosphat. Um dieses Ergebnis zu verifizieren und die einzusetzende DNA Menge zu ermitteln wurden Reporterexperimente durchgeführt. Im Reporterexperiment wurden die oben genannten Transfektionsmethoden miteinander verglichen. Da die β -Galaktosidase Messung, die für die Normierung der Reporterexperimente verwendet wird (siehe Material und Methoden), nur bei der Transfektion mit Lipofectamine LTX zu Ergebnissen über dem Hintergrund führte, wurde für die weiteren Versuche die Transfektion mit Lipofectamine LTX verwendet. Um die Luziferase Aktivität und Luziferase mRNA in Reporterexperimenten bzw. Real-Time PCR Versuchen optimal messen zu können wurden verschiedene Plasmid Mengen in A549 Zellen mit der Lipofectamine LTX Methode transfiziert. Im Reporterexperiment waren pro Loch einer 6-Lochplatte 0,1ng bis 100ng Reporter-Plasmid-DNA im gut messbaren Bereich. In der ebenfalls durchgeführten Real-Time PCR waren 10ng bis 100ng im gut messbaren Bereich. In späteren Versuchen mit Kotransfektionen von p38 oder TAB1 wurden 200ng des pSG-CCL5-3'UTR Plasmids eingesetzt. In den Versuchsergebnissen zeigte sich kein Unterschied bei Transfektion von 20ng oder 200ng DNA.

Actinomycin D blockiert die mRNA Neusynthese, so dass die Menge der mRNA abfällt. Versuche mit Verwendung von Actinomycin D messen somit speziell posttranskriptionelle Effekte. Um Actinomycin D abhängige Einflüsse zu messen, wurden Versuche mit 20ng Reporter-Plasmid durchgeführt.

4.2 Transkriptionelle Regulation des Chemokins CCL5 durch den TAB1-p38 Signalweg

TAB1 wurde zunächst als TAK1 (MAPKKK TAK1) bindendes Protein identifiziert [48], das TAK1 aktiviert [55] und inhibiert [11]. Darüber hinaus weisen zusätzliche Daten auf spezifische Funktionen von TAB1 in der TAK1 Signalweiterleitung hin, ohne dass die Bedeutung von TAB1 für die TAK1 Aktivierung bisher vollständig geklärt werden konnte [119], [50], [56], [51], [54]. Im Gegensatz hierzu zeigte der Knockout von TAB1 eine unveränderte TAK1 Signalweiterleitung [6]. Vor diesem Hintergrund entstand in der Literatur eine Kontroverse über die Funktion von TAB1.

Es ist in der Literatur bekannt, dass p38 als Teil der MAPK-Kaskade abhängig von TAK1 und MKK6 aktiviert wird [120]. Weiter ist bekannt, dass p38 nach Aktivierung innerhalb der MAPK-Kaskade die Transkription durch Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren beeinflusst [8] und die mRNA-Stabilität unter anderem über MK2 beeinflusst [107], [108] und [83]. Des Weiteren ist bekannt, dass p38 unabhängig von der MAPK-Kaskade durch Autophosphorylierung nach Interaktion mit TAB1 aktiviert werden kann [26]. Die Stimuli die diese MAPK-Kaskade unabhängige Aktivierung von p38 bewirken und die transkriptionellen oder posttranskriptionellen Auswirkungen sind bisher unbekannt.

Fehlt TAB1 fehlen in der Folge IL-1 induzierbare Änderungen von p38, JNK oder NF- κ B [50], [51], [6], [52] und [53]. Zudem wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Sekretion von CCL5 in Mef Zellen von TAB1 abhängig ist [53]. Daher untersuchen die nachfolgenden Versuche die transkriptionellen oder posttranskriptionellen Auswirkungen der MAPK-Kaskade unabhängigen Aktivierung von p38 durch TAB1.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die mRNA Expression von CCL5 in Experimenten mit dem CCL5 Promotor untersucht. In dem in diesen Versuchen eingesetzten Konstrukt reguliert der CCL5 Promotor ein Luziferasegen. In der Real-Time PCR wurde die Luziferase mRNA bestimmt. Im Reportergenversuch wurde die Luziferaseaktivität des translatierten Luziferasegens gemessen. Als Positivkontrolle konnte MEKK1 den CCL5 Promotor aktivieren (6-fach). Keinen Einfluss auf den CCL5 Promotor zeigte sich durch IL-1, TNF- α oder IFN- γ . Ebenfalls keinen Einfluss auf den CCL5 Promotor hatten p38, TAB1 und TAB1 Δ S, bei dem die Serine 452-457 deletiert sind.

In diesem Assay reguliert TAB1 die CCL5 Genexpression nicht auf transkriptioneller Ebene. Ob TAB1 die CCL5 Genexpression posttranskriptionell reguliert, wurde in den nachfolgenden Experimenten untersucht.

4.3 Posttranskriptionelle Regulation des Chemokins CCL5 durch den TAB1-p38 Signalweg

4.3.1 Regulation der CCL5 3'UTR in Mef TAB1 Knockout Zellen, rekonstituiert mit TAB1 oder TAB1 Δ S

In früher durchgeführten Experimenten mit Mef TAB1 Knockout Zellen, rekonstituiert mit TAB1 Wildtyp, zeigte sich TAB1 essentiell für die IL-1 induzierte CCL5 Sekretion [53], Figure 6. Versuche von Wolf et al. 2011 [53] mit stabil transfizierten Mef Zellen zeigten nach IL-1 Stimulation eine achtfach erhöhte CCL5 Sekretion von Mef Zellen rekonstituiert mit TAB1 im Vergleich mit Mef TAB1 Knockout Zellen. Bei Mef TAB1 Δ S Zellen wurden die Aminosäuren 452-457 deletiert. Diese Deletion führte zu einer gesteigerten CCL5 Sekretion [53], Figure 6. Mef TAB1 Δ S Zellen zeigten eine dreizehnfach erhöhte CCL5 Sekretion im Vergleich mit Mef TAB1 Knockout Zellen. Die Serine 452-457 wurden als Phosphorylierungsstellen identifiziert [53], deren Funktion in Bezug auf die CCL5 3'UTR in dieser Arbeit untersucht wird. Durch die fehlende IL-1 Responsivität konnten die Ergebnisse der Versuche von Wolf et al. 2011 im ersten Teil dieser Arbeit (Kapitel 4.1.2) nicht wiederholt werden.

Die mit TAB1 oder TAB1 Δ S rekonstituierten Mef TAB1 Knockout Zellen exprimieren konstitutiv TAB1 oder TAB1 Δ S ohne den störenden Hintergrund einer endogenen TAB1 Expression. Dadurch bieten diese Mef Zelllinien gute Voraussetzungen für Real-Time PCR und Reporter-genversuche, in denen Einflüsse von TAB1 oder TAB1 Δ S gemessen werden sollen. Um den Einfluss von TAB1 und TAB1 Δ S auf die CCL5 3'UTR zu untersuchen wurden murine embryonale Fibroblasten transient mit dem pSG-CCL5-3'UTR oder dem Kontrollvektor pSG-EMPTY transfiziert (Abbildung 4.7).

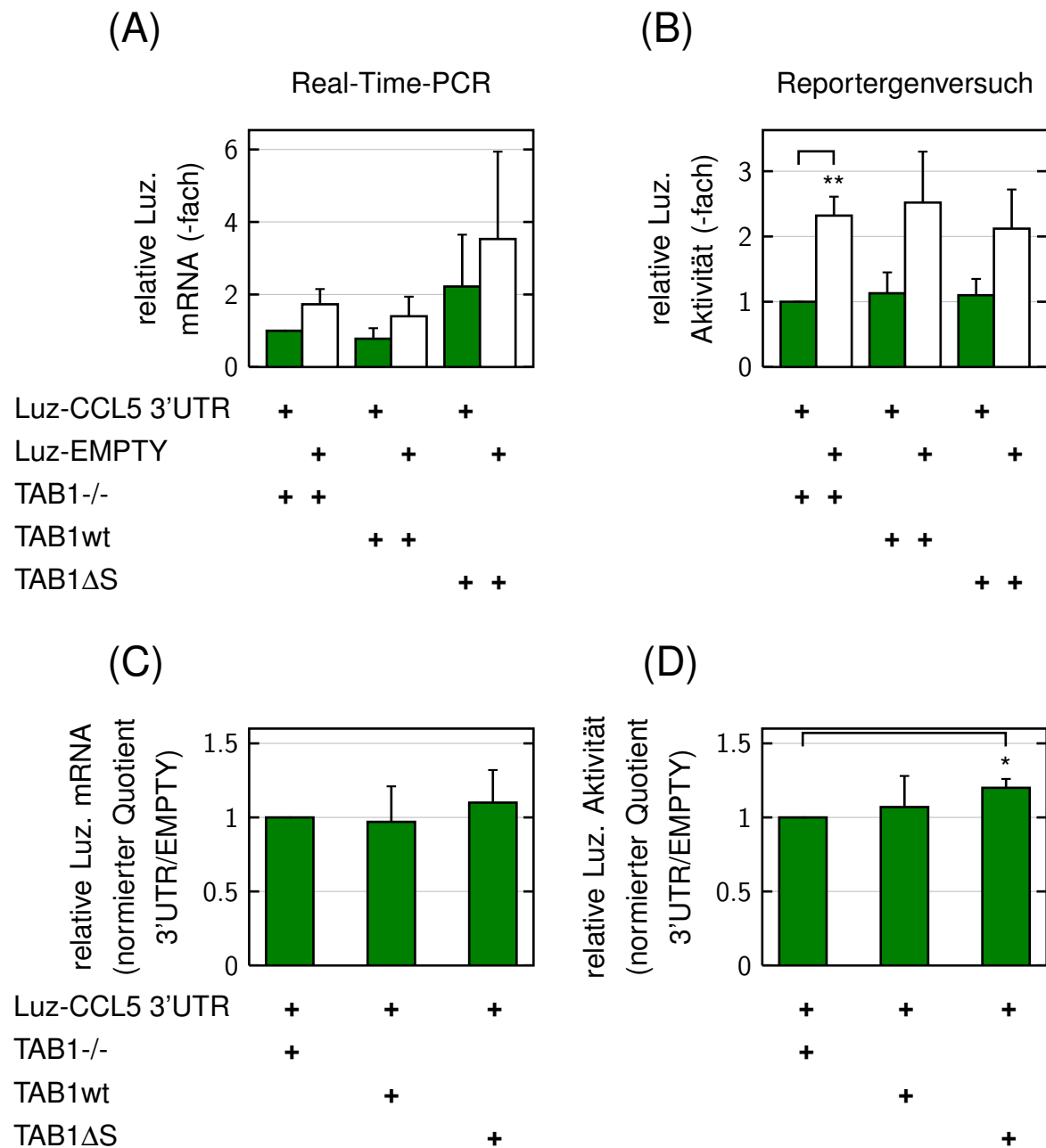


Abbildung 4.7: Die Rekonstitution von Mef TAB1 Knockout Zellen mit TAB1 oder TAB1ΔS hat keinen Einfluss auf den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR.

Mef TAB1 Knockout Zellen (TAB1^{-/-}), Mef TAB1 Knockout Zellen rekonstituiert mit TAB1 Wildtyp (TAB1wt) und Mef TAB1 Knockout Zellen rekonstituiert mit TAB1ΔS (TAB1ΔS) wurden in 3-Löcher/Ansatz einer 6-Lochplatte ausgesät. Zellen wurden pro Loch mit 250ng pSG-CCL5-3'UTR oder 250ng des Kontrollvektors pSG-EMPTY jeweils zusammen mit 750ng SV-40-β-Gal transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen der 3-Löcher/Ansatz gemeinsam geerntet und anschließend in zwei Hälften geteilt. Aus der ersten Hälfte wurde die

gesamte RNA extrahiert und die Luziferase mRNA in der Real-Time PCR bestimmt. Die zweite Hälfte wurde lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Luziferaseaktivität und die Luziferase mRNA wurden auf die β -Galaktosidaseaktivität normiert.

In Abbildung A ist die relative Luziferase mRNA Expression und in Abbildung B die relative Luziferaseaktivität mit und ohne CCL5 3'UTR dargestellt. Der Wert der Luziferase-CCL5 3'UTR mit TAB1 Knockout (TAB1^{-/-}) wurde auf 1 gesetzt und die anderen Werte hierzu in Verhältnis gesetzt.

In den Abbildungen C und D sind die Messwerte aus den Abbildungen A und B auf die Kontrolle pSG-EMPTY normiert dargestellt. Werte der Abbildung C werden aus Werten der Abbildung A berechnet. Werte der Abbildung D werden aus Werten der Abbildung B berechnet. Zunächst werden Quotienten Luz-CCL5 3'UTR/Luz-EMPTY gebildet. Der Quotient Luz-CCL5 3'UTR/Luz-EMPTY ohne TAB1 (TAB1^{-/-}) wird auf 1 gesetzt und die anderen Quotienten in Verhältnis gesetzt. Ein ansteigender Wert bedeutet einen reduzierten destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR im Verhältnis zum EMPTY Kontrollvektor.

Die Messwerte der Abbildungen A-D sind als Mittelwerte \pm S.E.M. gezeigt, die aus 3 unabhängigen Experimenten resultieren. Irrtumswahrscheinlichkeit: *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$.

Die CCL5 3'UTR hat einen (posttranskriptionell) destabilisierenden Effekt auf die Luziferase mRNA (Abbildung 4.7 A). Dieser destabilisierende Effekt setzt sich auf Ebene der Translation fort und zeigt sich nachfolgend auf der Proteinebene, gemessen als verminderte Luziferaseaktivität im Reportergenversuch (Abbildung 4.7 B). Mef Zellen mit rekonstituiertem TAB1 oder rekonstituiertem TAB1 Δ S zeigen keinen Effekt im Vergleich zu Mef TAB1 Knockout Zellen im Bezug auf die Destabilisierung der CCL5 3'UTR (Abbildung 4.7 C und D). Die Steigerung der relativen Luziferaseaktivität um 20% durch Einfluss von TAB1 Δ S auf die CCL5 3'UTR ist signifikant, aber sehr gering, so dass nur eine Tendenz zur Stabilisierung durch TAB1 Δ S angenommen werden kann (Abbildung 4.7 D). In Abbildung 4.7 A zeigt sich ein Anstieg der Luziferase mRNA nach Rekonstitution von TAB1 Δ S. Der Anstieg der Luziferase mRNA nach Rekonstitution von TAB1 Δ S betrifft den Luziferase-CCL5 3'UTR Vektor und den Luziferase EMPTY Kontrollvektor gleichermaßen. Daher ist dieser Effekt am ehesten auf die Aktivierung des identischen Promotors der beiden Konstrukte durch TAB1 Δ S zurückzuführen. Da TAB1 Δ S den Promotor des Luziferase-CCL5 3'UTR Plasmids und des Luziferase-EMPTY Plasmids gleichermaßen aktiviert, bleibt der destabilisierende Effekt der CCL5 3' UTR unverändert (Abbildung 4.7 A und C). Da TAB1 Mef Zellen keine IL-1 Responsivität aufweisen (Kapitel 4.1.2), und in diesem Versuch TAB1 und

TAB1 Δ S keinen Einfluss auf die Stabilisierung der CCL5 3'UTR ausüben, wird diese Zelllinie verworfen und für alle weiteren Versuche A549 Zellen verwendet.

4.3.2 Regulation der CCL5 3'UTR durch TAB1 und TAB1 Δ S in A549 Zellen

A549 Zellen zeigten in Kapitel 4.1.2 eine starke IL-1 abhängige CCL5 Genexpression. Ob TAB1 und die Aminosäuren 452-457 von TAB1, als Teil der IL-1 Entzündungskaskade, einen Einfluss auf die CCL5 3'UTR in A549 Zellen haben wurde als nächstes untersucht (Abbildung 4.8).

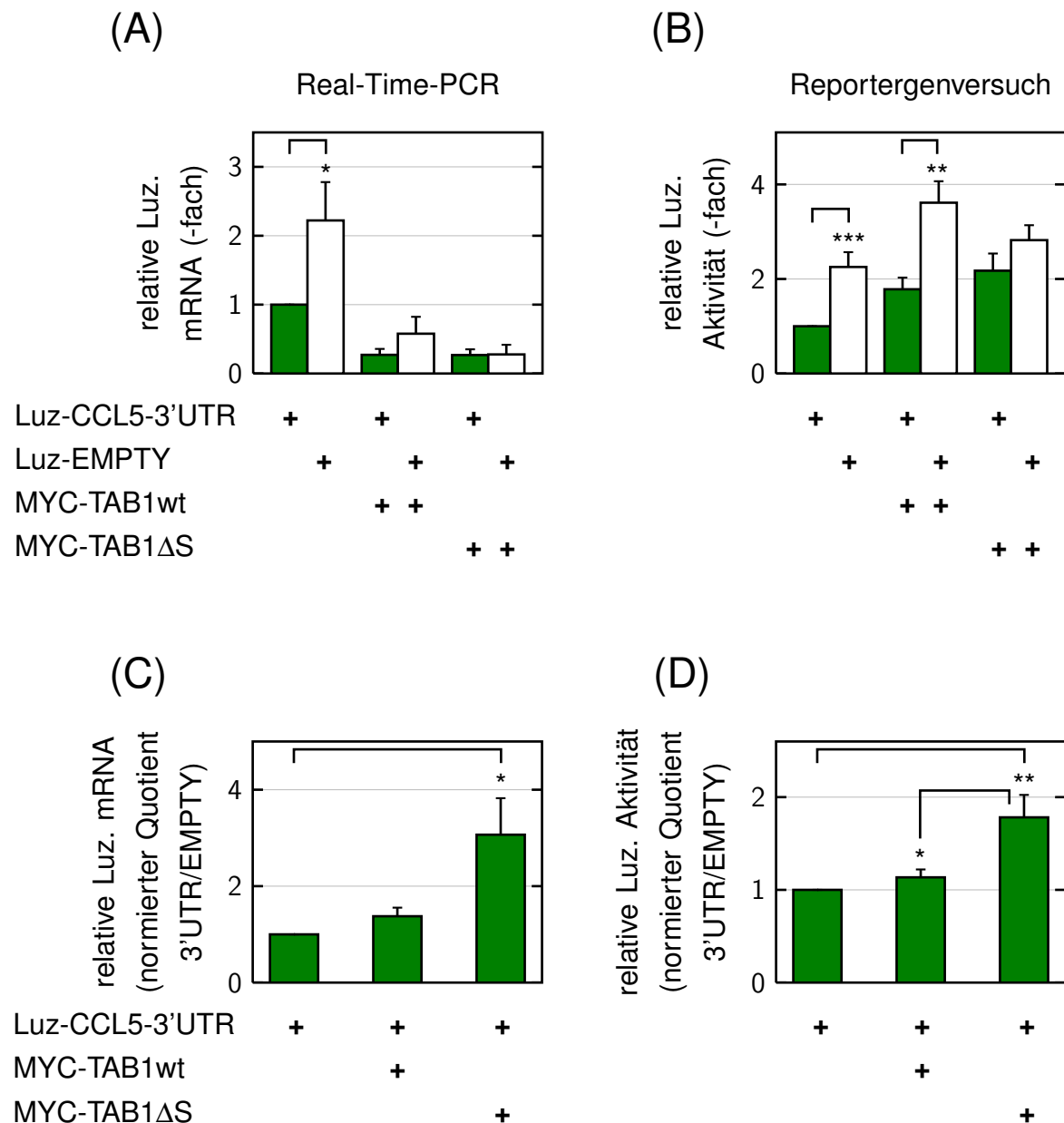


Abbildung 4.8: Die Deletion der Aminosäuren 452-457 von TAB1 hebt den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA in A549 Zellen auf.

A549 Zellen wurden in 2-Löcher/Ansatz einer 6-Lochplatte ausgesäht. Zellen wurden pro Loch mit 100ng pSG-CCL5-3'UTR oder 100ng des Kontrollvektors pSG-EMPTY jeweils zusammen mit 400ng SV-40-β-Gal transient transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen pro Loch mit 2μg MYC-TAB1wt (MYC-TAB1 Wildtyp) oder 2μg MYC-TAB1ΔS kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen der 2-Löcher/Ansatz gemeinsam geerntet und anschließend in

zwei Hälften geteilt. Aus der ersten Hälfte wurde die gesamte RNA extrahiert und die Luziferase mRNA in der Real-Time PCR bestimmt. Die zweite Hälfte wurde lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Luziferaseaktivität und die Luziferase mRNA wurden auf die β -Galaktosidaseaktivität normiert.

In Abbildung A ist die relative Luziferase mRNA Expression und in Abbildung B die relative Luziferaseaktivität mit und ohne CCL5 3'UTR dargestellt. Der Wert der Luziferase-CCL5 3'UTR ohne Kotransfektion von TAB1 oder TAB1 Δ S wurde auf 1 gesetzt und die anderen Werte hierzu in Verhältnis gesetzt.

In den Abbildungen C und D sind die Messwerte aus den Abbildungen A und B auf die Kontrolle pSG-EMPTY normiert dargestellt. Werte der Abbildung C werden aus Werten der Abbildung A berechnet. Werte der Abbildung D werden aus Werten der Abbildung B berechnet. Hierzu werden zunächst die Quotienten Luz-CCL5 3'UTR/Luz-EMPTY gebildet. Der Quotient Luz-CCL5 3'UTR/Luz-EMPTY ohne TAB1 oder TAB1 Δ S wird auf 1 gesetzt und die anderen Quotienten in Verhältnis gesetzt. Ein ansteigender Wert bedeutet einen reduzierten destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR im Verhältnis zum EMPTY Kontrollvektor.

Die Messwerte der Abbildungen A-D sind als Mittelwerte \pm S.E.M. gezeigt. Bei den Real-Time-PCR Versuche resultieren Mittelwerte und \pm S.E.M. aus 7 unabhängigen Experimenten. Bei den Reportergenversuche resultieren Mittelwerte und \pm S.E.M. aus 8 unabhängigen Experimenten.

Die Kontrollansätze ohne Kotransfektion von TAB1 und p38 sind in den Versuchen der Abbildungen 4.8 bis 4.11 identisch. Aus diesem Grund wurden die Mittelwerte der relativen Luziferase mRNA und der relativen Luziferase Aktivität mit und ohne CCL5 3'UTR ohne Kotransfektion (Abbildungen A und B) aus den Versuchen der Abbildungen 4.8 bis 4.11 gemittelt. Die Mittelwerte und der \pm S.E.M. resultieren daher aus 18 unabhängigen Experimenten. Irrtumswahrscheinlichkeit: *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$.

Analog zu den Versuchen mit Mef Zellen zeigt dieser Versuch in A549 Zellen, dass die CCL5 3'UTR einen 2-fach (posttranskriptionell) destabilisierenden Effekt auf die Luziferase mRNA bewirkt (Abbildung 4.8 A). Dieser destabilisierende Effekt wird auf Ebene der Translation bewahrt und zeigt sich ebenfalls in einer verminderten Luziferaseaktivität im Reportergenversuch (Abbildung 4.8 B).

In Abbildung 4.8 A zeigt sich nach Expression von TAB1wt ein Abfall sowohl der CCL5 3'UTR, als auch des Kontrollvektors (EMPTY). Da der Abfall die CCL5 3'UTR und den Kontrollvektor in gleicher Stärke betrifft ist der Abfall die CCL5 3'UTR betreffend unspezifisch. Am ehesten ist dies ein Effekt von TAB1wt auf den Promotor, der bei beiden Plasmiden identisch ist. Das der Abfall CCL5 3'UTR und den Kontrollvek-

tor in gleicher Stärke betrifft wird deutlich, wenn das Verhältnis von CCL5 3'UTR zu EMPTY betrachtet wird (Abbildung 4.8 A). Zur genauen Beurteilung ist es deshalb sinnvoll, das Verhältnis von CCL5 3'UTR zu EMPTY zusätzlich direkt darzustellen. Dazu dient Abbildung 4.8 C. Der dort berechnete Quotient CCL5 3'UTR/EMPTY ohne TAB1 wurde auf 1 gesetzt. Mit TAB1 zeigt sich eine leichte, nicht signifikante Stabilisierung (Abbildung 4.8 C). Zusammengefasst hat TAB1 einen sehr geringen Einfluss auf den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR.

Während die Expression von TAB1 diesen Effekt nicht aufheben kann, ist die Deletionsmutant von TAB1 (TAB1 Δ S), der die Serine 452-457 fehlen, in der Lage den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR fast vollständig aufzuheben. Damit führt die TAB1 Deletionsmutante im Vergleich mit der Kontrolle ohne TAB1 zu einer Stabilisierung von Faktor 2-3 der Luziferase mRNA und des Luziferaseproteins (Abbildung 4.8 C und D).

4.3.3 Regulation der CCL5 3'UTR durch die p38 MAPK in Abhängigkeit von TAB1 in A549 Zellen

In der Literatur ist p38 als mRNA stabilisierendes Protein für inflammatorische mRNA beschrieben. Bekannt ist, dass p38 α AREs (AU-rich elements) in der 3'UTR verschiedener inflammatorischer mRNA beeinflusst [42] (Kapitel 1.7).

Vorarbeiten von Wolf et al. [53] zeigten, dass TAB1 die Autophosphorylierung und Aktivierung von p38 induziert. Das Phosphorylierungsmotiv 452-457 in TAB1 war Voraussetzung für die Autophosphorylierung von p38. Des Weiteren phosphorylierte p38 TAB1 an seinem Serincluster 452-457. Hierbei waren die Phosphorylierungsstellen T180 und Y182 von p38 Voraussetzung für die Phosphorylierung des Serinclusters 452-457 von TAB1 [53], Figure 4.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass TAB1 innerhalb der Zelle abhängig von dem Serincluster 452-457 unterschiedlich lokalisiert ist. TAB1 war überwiegend im Zellkern und TAB1 Δ S, dem der Serincluster fehlt, im Zytoplasma lokalisiert. Auch für p38 wurde die intrazelluläre Lokalisation untersucht. P38 war überwiegend im Zellkern lokalisiert. Zusammen mit TAB1 Δ S kolokalisierte p38 mit TAB1 Δ S in das Zytoplasma [53].

Weiterhin ist im Bezug auf CCL5 bekannt, dass p38 die mRNA inflammatorisch wichtiger Gene beeinflusst [107], [108], [109], [83] und die Halbwertszeit von CCL5 mRNA erhöht [117].

Die biologische Funktion der oben beschriebenen p38 TAB1 Interaktionen wurde bisher nicht untersucht. Ein Effekt auf die CCL5 Genexpression wäre insofern bedeutsam, dass CCL5 ein Effektorprotein der Entzündungskaskade darstellt.

Der nachfolgende Versuch untersucht daher den Einfluss von p38, TAB1, sowie dem Serincluster 452-457 von TAB1 auf die CCL5 3'UTR. (Abbildung 4.9).

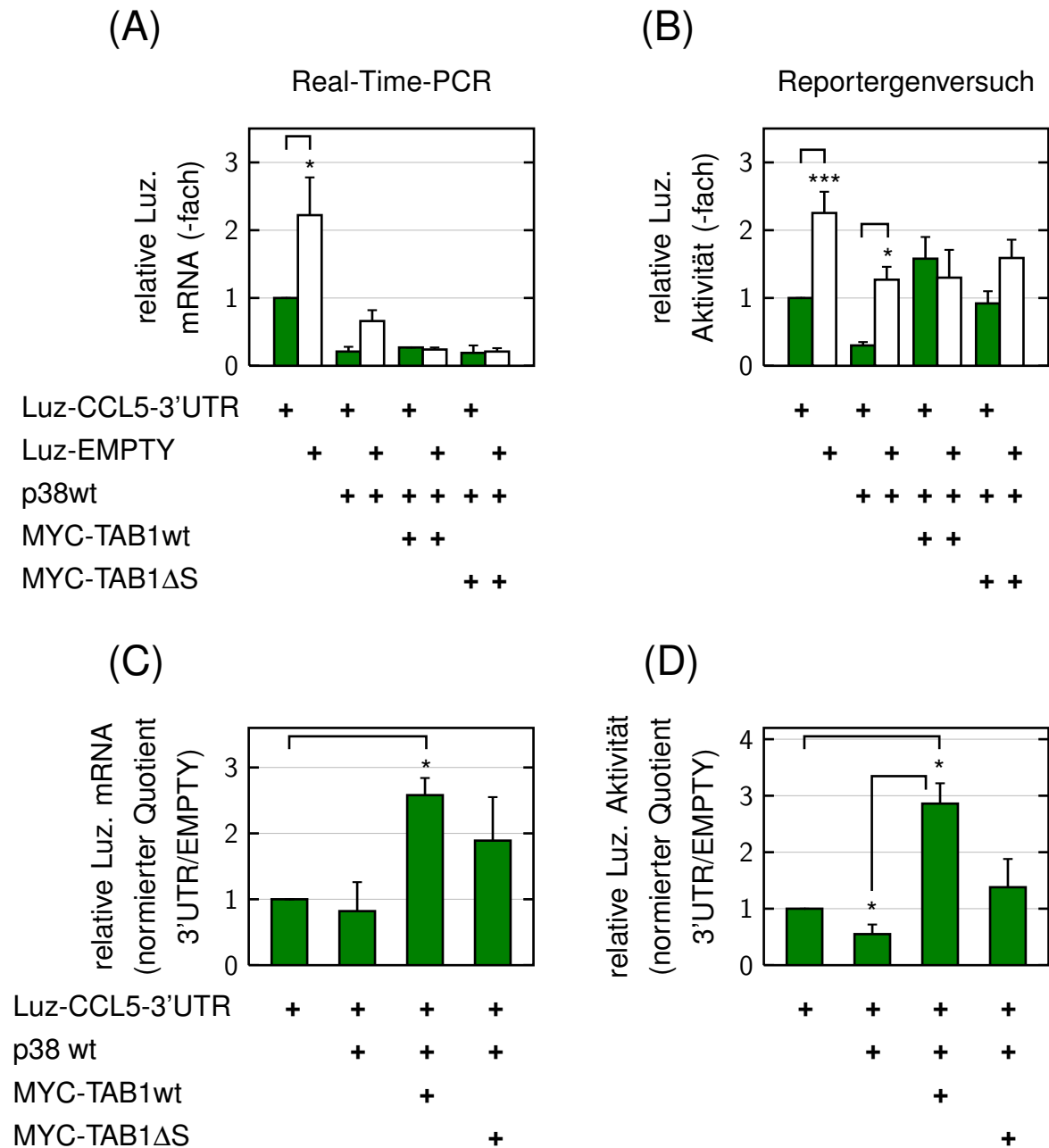


Abbildung 4.9: TAB1 induziert die p38 eingeleitete mRNA Stabilisierung von CCL5 in Abhängigkeit von den Serinen 452-457.

A549 Zellen wurden in 2-Löcher/Ansatz einer 6-Lochplatte ausgesäht. Zellen wurden pro Loch mit 100ng pSG-CCL5-3'UTR oder 100ng des Kontrollvektors pSG-EMPTY jeweils zusammen mit 400ng SV-40-β-Gal transient transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen pro Loch mit 1,75μg p38 alleine, oder mit 0,75μg MYC-TAB1wt (MYC-TAB1 Wildtyp) oder 0,75μg MYC-TAB1ΔS kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen der 2-Löcher/Ansatz gemeinsam

geerntet und anschließend in zwei Hälften geteilt. Aus der ersten Hälfte wurde die gesamte RNA extrahiert und die Luziferase mRNA in der Real-Time PCR bestimmt. Die zweite Hälfte wurde lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Luziferaseaktivität und die Luziferase mRNA wurden auf die β -Galaktosidaseaktivität normiert.

In Abbildung A ist die relative Luziferase mRNA Expression und in Abbildung B die relative Luziferaseaktivität mit und ohne CCL5 3'UTR dargestellt. Der Wert der Luziferase-CCL5 3'UTR ohne Kotransfektion von p38, TAB1 oder TAB1 Δ S wurde auf 1 gesetzt und die anderen Werte hierzu in Verhältnis gesetzt.

In den Abbildungen C und D sind die Messwerte aus den Abbildungen A und B auf die Kontrolle pSG-EMPTY normiert dargestellt. Werte der Abbildung C werden aus Werten der Abbildung A berechnet. Werte der Abbildung D werden aus Werten der Abbildung B berechnet. Hierzu werden zunächst die Quotienten Luz-CCL5 3'UTR/Luz-EMPTY gebildet. Der Quotient Luz-CCL5 3'UTR/Luz-EMPTY ohne p38, TAB1 oder TAB1 Δ S wird auf 1 gesetzt und die anderen Quotienten in Verhältnis gesetzt. Ein ansteigender Wert bedeutet einen reduzierten destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR im Verhältnis zum EMPTY Kontrollvektor.

Die Messwerte der Abbildungen A-D sind als Mittelwerte \pm S.E.M. gezeigt. Bei den Real-Time-PCR und bei den Reporter-genversuchen resultieren Mittelwerte und \pm S.E.M. aus 2 unabhängigen Experimenten.

Die Kontrollansätze ohne Kotransfektion von TAB1 und p38 sind in den Versuchen der Abbildungen 4.8 bis 4.11 identisch. Aus diesem Grund wurden die Mittelwerte der relativen Luziferase mRNA und der relativen Luziferase Aktivität mit und ohne CCL5 3'UTR ohne Kotransfektion (Abbildungen A und B) aus den Versuchen der Abbildungen 4.8 bis 4.11 gemittelt. Die Mittelwerte und der \pm S.E.M. resultieren daher aus 18 unabhängigen Experimenten. Irrtumswahrscheinlichkeit: *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$.

Ausgangspunkt der Beschreibung dieses Versuches ist der destabilisierende Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA.

Sowohl mit als auch ohne p38 zeigt sich der destabilisierende Effekt der CCL5 3'UTR auf die relative Luziferase mRNA und die relative Luziferase Aktivität (Abbildung 4.9 A und B). Nach Bildung des Verhältnisses von 3'UTR zu EMPTY (Abbildung 4.9 C und D) zeigt sich deshalb mit und ohne p38 ein Wert um Eins. P38 mit TAB1 hebt den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA und Luziferase Protein vollständig auf (Abbildung 4.9 A und B). Das Verhältnis von 3'UTR zu EMPTY (Abbildung 4.9 C und D) zeigt eine starke (3-fache) Stabilisierung der Luziferase mRNA und Erhöhung (3-fach) der Luziferase Aktivität durch den Einfluss von p38 und TAB1 auf die CCL5 3'UTR. P38 mit TAB1 Δ S hebt den destabilisierenden

Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA und Luziferase Protein teilweise auf (Abbildung 4.9 A und B). Das Verhältnis von 3'UTR zu EMPTY (Abbildung 4.9 C und D) zeigt eine leichte Stabilisierung der Luziferase mRNA und Erhöhung der Luziferase Aktivität durch den Einfluss von p38 und TAB1 Δ S auf die CCL5 3'UTR. Die relative Luziferase mRNA (Abbildung 4.9 A) und die relative Luziferase Aktivität (Abbildung 4.9 A) zeigen wie oben beschrieben vergleichbare Ergebnisse. Aufgrund der größeren Fehler (\pm S.E.M.) der Real-Time PCR sind die Aussagen auf mRNA Ebene eingeschränkt.

Zusammengefasst zeigte p38wt alleine keinen Effekt auf die CCL5 3'UTR. P38wt mit TAB1 Δ S und noch stärker p38wt mit TAB1wt vermindern den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA. Das bedeutet, dass p38 mit TAB1 wt einen stärkeren Effekt auf die mRNA Stabilisierung als p38 mit TAB1 Δ S ausübt. Dies steht in konsistentem Zusammenhang mit den Versuchen von Wolf et al. [53]. Dort zeigte TAB1 eine starke und TAB1 Δ S eine schwache Erhöhung der p38 Aktivierung und Autophosphorylierung [53].

4.3.4 Einfluss der essentiellen phosphoacceptor sites T180 und Y182 von p38 auf die Stabilisierung der CCL5 3'UTR in Abhängigkeit von TAB1 in A549 Zellen

Funktionell wichtig für die Funktion von p38 sind die Aminosäuren Threonin180 und Tyrosin182 des TGY Motivs von p38. Innerhalb der MAPK-Kaskade wird p38 durch MKK6 an diesen Aminosäuren aktiviert. Werden die Phosphorylierungsstellen an T180 oder Y182 zu Alanin (T180A) oder Phenylalanin (Y182F) mutiert, so verändert sich die Aktivierbarkeit der p38 Mutanten. P38Y182F kann durch MKK6 noch aktiviert werden, aber deutlich schwächer als p38wt. P38T180A kann nicht mehr durch MKK6 aktiviert werden [121]. Ein alternativer Aktivierungsmechanismus von p38 ist die Autophosphorylierung von p38. Die Autophosphorylierung von p38 ist MKK6 [121], welches Teil der MAPK-Kaskade ist, unabhängig, und wird durch TAB1 [26] vermittelt. Diese Autophosphorylierung führt zur Aktivierung von p38. P38T180 und p38Y182 sind wichtige Aminosäuren für die Autophosphorylierung. Wird eine der beiden Aminosäuren mutiert (p38T180A oder p38Y182F), dann ist die Autophosphorylierung wesentlich schwächer. Wolf et al. zeigten, dass die Autophosphorylierung von p38Y182F an T180 bei Koexpression von TAB1 deutlich verstärkt ist [53]. Die Funktion der verstärkten Autophosphorylierung von p38Y182F an T180 ist bisher un-

bekannt. Die Y182F Mutante behält im Vergleich mit p38 Wildtyp eine verminderte Aktivität und die T180A Mutante von p38 verliert ihre Aktivität vollständig. Das die intrinsisch aktive Mutante p38Y182F eine verminderte Aktivität hat, wird durch eine verminderte Substraterkennung durch p38Y182F erklärt [121].

Die beiden nachfolgenden Versuche untersuchen, ob die im vorherigen Versuch gezeigte TAB1 induzierte p38 Regulation der CCL5 mRNA Stabilisierung von der Autophosphorylierung der Aminosäuren T180 oder Y182 von p38 abhängt.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die phosphoacceptor site T180 von p38 in Abhängigkeit von TAB1 und seinen Serinen 452-457 auf die CCL5 3'UTR hat, wurde der folgende Versuch durchgeführt (Abbildung 4.10).

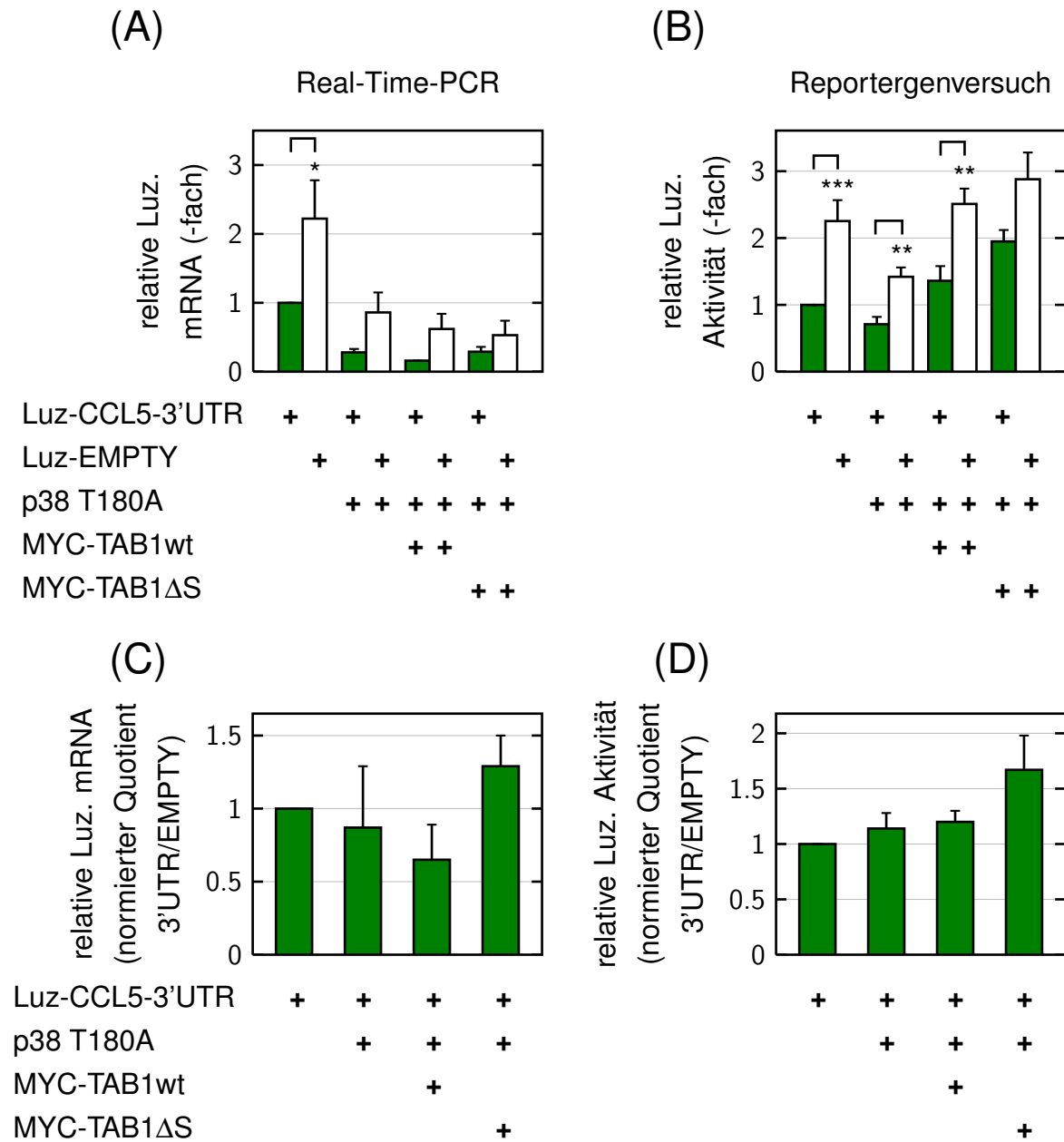


Abbildung 4.10: T180 von p38 ist essentiell für die TAB1 induzierte Stabilisierung der CCL5 3'UTR.

A549 Zellen wurden in 2-Löcher/Ansatz einer 6-Lochplatte ausgesäht. Zellen wurden pro Loch mit 100ng pSG-CCL5-3'UTR oder 100ng des Kontrollvektors pSG-EMPTY jeweils zusammen mit 400ng SV-40-β-Gal transient transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen pro Loch mit 1,75μg p38T180A alleine, oder mit 0,75μg MYC-TAB1wt (MYC-TAB1 Wildtyp) oder 0,75μg MYC-TAB1ΔS kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen der 2-Löcher/Ansatz gemeinsam geerntet und anschließend in zwei Hälften geteilt. Aus der ersten Hälfte wurde die

gesamte RNA extrahiert und die Luziferase mRNA in der Real-Time PCR bestimmt. Die zweite Hälfte wurde lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Luziferaseaktivität und die Luziferase mRNA wurden auf die β -Galaktosidaseaktivität normiert.

In Abbildung A ist die relative Luziferase mRNA Expression und in Abbildung B die relative Luziferaseaktivität mit und ohne CCL5 3'UTR dargestellt. Der Wert der Luziferase-CCL5 3'UTR ohne Kotransfektion von p38T180A, TAB1 oder TAB1 Δ S wurde auf 1 gesetzt und die anderen Werte hierzu in Verhältnis gesetzt.

In den Abbildungen C und D sind die Messwerte aus den Abbildungen A und B auf die Kontrolle pSG-EMPTY normiert dargestellt. Werte der Abbildung C werden aus Werten der Abbildung A berechnet. Werte der Abbildung D werden aus Werten der Abbildung B berechnet. Hierzu werden zunächst die Quotienten Luz-CCL5 3'UTR/Luz-EMPTY gebildet. Der Quotient Luz-CCL5 3'UTR/Luz-EMPTY ohne p38, TAB1 oder TAB1 Δ S wird auf 1 gesetzt und die anderen Quotienten in Verhältnis gesetzt. Ein ansteigender Wert bedeutet einen reduzierten destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR im Verhältnis zum EMPTY Kontrollvektor.

Die Messwerte der Abbildungen A-D sind als Mittelwerte \pm S.E.M. gezeigt. Bei den Real-Time-PCR Versuchen resultieren Mittelwerte und \pm S.E.M. aus 2 unabhängigen Experimenten. Bei den Reportergenversuchen resultieren Mittelwerte und \pm S.E.M. aus 5 unabhängigen Experimenten.

Die Kontrollansätze ohne Kotransfektion von TAB1 und p38 sind in den Versuchen der Abbildungen 4.8 bis 4.11 identisch. Aus diesem Grund wurden die Mittelwerte der relativen Luziferase mRNA und der relativen Luziferase Aktivität mit und ohne CCL5 3'UTR ohne Kotransfektion (Abbildungen A und B) aus den Versuchen der Abbildungen 4.8 bis 4.11 gemittelt. Die Mittelwerte und der \pm S.E.M. resultieren daher aus 18 unabhängigen Experimenten. Irrtumswahrscheinlichkeit: *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$.

Ausgangspunkt der Beschreibung dieses Versuches ist der destabilisierende Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA.

Unabhängig von p38T180A oder p38T180A mit TAB1 zeigt sich der destabilisierende Effekt der CCL5 3'UTR auf die relative Luziferase mRNA, der sich auf Ebene des Luziferase Proteins fortsetzt (Abbildung 4.10 A und B). Nach Bildung des Verhältnisses von 3'UTR zu EMPTY (Abbildung 4.10 C und D) zeigt sich daher ohne p38T180A, mit p38T180A oder mit p38T180A und TAB1 keine Veränderung (Stabilisierung) für die relative Luziferase mRNA. In diesem Versuch hebt nur TAB1 Δ S, wahrscheinlich unabhängig von der Koexpression von p38T180A, den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA minimal auf, was zu einer gesteigerten Luziferase Aktivität und somit Translation des Luziferase Proteins führt (Abbildung 4.10 A

und B). Nach Bildung des Verhältnisses von 3'UTR zu EMPTY wird die leichte Stabilisierung der Luziferase mRNA (Abbildung 4.10 C) und des Luziferaseproteins ($p=0,06$) (Abbildung 4.10 D) durch TAB1 Δ S deutlicher sichtbar. Der TAB1 Δ S Effekt dieses Experiments ist vergleichbar mit der Stabilisierung durch TAB1 Δ S alleine (Abbildung 4.8). Die relative Luziferase mRNA (Abbildung 4.10 A) und die relative Luziferase Aktivität (Abbildung 4.10 B) zeigen vergleichbare Ergebnisse.

Zusammenfassend konnte p38TA mit oder ohne TAB1wt den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf Luziferase mRNA nicht vermindern. Dieser Effekt setzte sich nach Translation auf das Luziferaseprotein fort. Ausschließlich TAB1 Δ S mit p38TA konnten den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA vergleichbar mit dem Ergebnis aus Abbildung 4.8 minimal aufheben. P38 mit TAB1 konnten im vorherigen Versuch (Abbildung 4.9) den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA vermindern. P38T180 mit TAB1 konnten das in diesem Versuch nicht. Das T180 von p38 ist daher essentiell für die TAB1 induzierte Luziferase mRNA Stabilisierung durch p38. Am ehesten ist die zu Anfang dieses Kapitels beschriebene TAB1 induzierte Autophosphorylierung von p38 an T180 bedeutsam für die Stabilisierung der Luziferase mRNA durch p38 und TAB1.

Bei der p38Y182F Mutante ist das Tyrosin zu Phenylalanin mutiert. Wie Eingangs beschrieben, ist dadurch die Autophosphorylierung von p38 stark reduziert und die Aktivität durch eine verschlechterte Substraterkennung stark reduziert [121].

Bei p38Y182F ist keine duale Phosphorylierung mehr an dem TGY Motiv möglich. Jedoch zeigten Wolf et al. eine verstärkte Autophosphorylierung an T180 bei Koexpression von TAB1. Die verstärkte Autophosphorylierung an T180 hat eine verstärkte Aktivität von p38YF im Bezug auf die Phosphorylierung von TAB1 innerhalb des Serinclusters zur Folge. TAB1 wird an seinen Serinen 452-457 durch p38YF stärker als durch p38wt phosphoryliert [53].

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die phosphoacceptor site Y182 von p38 in Abhängigkeit von TAB1 und seinen Serinen 452-457 auf die CCL5 3'UTR hat, wurde der folgende Versuch durchgeführt (Abbildung 4.11).

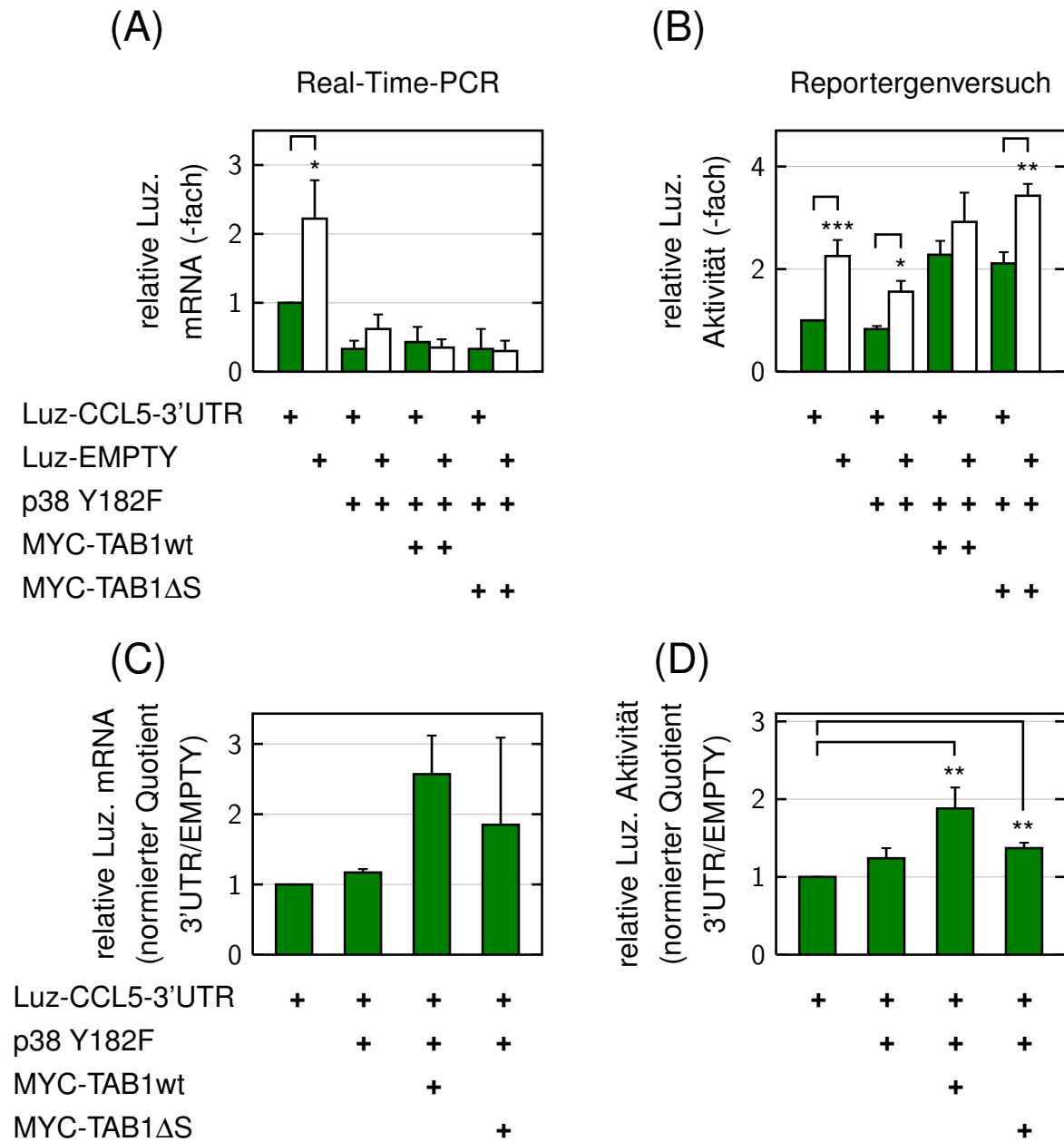


Abbildung 4.11: Die Mutation von Y182 führt zu einer intermediär aktiven Form von p38, die durch TAB1 noch aktivierbar ist.

A549 Zellen wurden in 2-Löcher/Ansatz einer 6-Lochplatte ausgesät. Zellen wurden pro Loch mit 100ng pSG-CCL5-3'UTR oder 100ng des Kontrollvektors pSG-EMPTY jeweils zusammen mit 400ng SV-40-β-Gal transient transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen pro Loch mit 1,75μg p38Y182F alleine, oder mit 0,75μg MYC-TAB1wt (MYC-TAB1 Wildtyp) oder 0,75μg MYC-TAB1ΔS kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen der 2-Löcher/Ansatz gemeinsam geerntet und anschließend in zwei Hälften geteilt. Aus der ersten Hälfte wurde die

gesamte RNA extrahiert und die Luziferase mRNA in der Real-Time PCR bestimmt. Die zweite Hälfte wurde lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Luziferaseaktivität und die Luziferase mRNA wurden auf die β -Galaktosidaseaktivität normiert.

In Abbildung A ist die relative Luziferase mRNA Expression und in Abbildung B die relative Luziferaseaktivität mit und ohne CCL5 3'UTR dargestellt. Der Wert der Luziferase-CCL5 3'UTR ohne Kotransfektion von p38Y182F, TAB1 oder TAB1 Δ S wurde auf 1 gesetzt und die anderen Werte hierzu in Verhältnis gesetzt.

In den Abbildungen C und D sind die Messwerte aus den Abbildungen A und B auf die Kontrolle pSG-EMPTY normiert dargestellt. Werte der Abbildung C werden aus Werten der Abbildung A berechnet. Werte der Abbildung D werden aus Werten der Abbildung B berechnet. Hierzu werden zunächst die Quotienten Luz-CCL5 3'UTR/Luz-EMPTY gebildet. Der Quotient Luz-CCL5 3'UTR/Luz-EMPTY ohne p38, TAB1 oder TAB1 Δ S wird auf 1 gesetzt und die anderen Quotienten in Verhältnis gesetzt. Ein ansteigender Wert bedeutet einen reduzierten destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR im Verhältnis zum EMPTY Kontrollvektor.

Die Messwerte der Abbildungen A-D sind als Mittelwerte \pm S.E.M. gezeigt. Bei den Real-Time-PCR Versuchen resultieren Mittelwerte und \pm S.E.M. aus 2 unabhängigen Experimenten. Bei den Reportergenversuchen resultieren Mittelwerte und \pm S.E.M. aus 4 unabhängigen Experimenten.

Die Kontrollansätze ohne Kotransfektion von TAB1 und p38 sind in den Versuchen der Abbildungen 4.8 bis 4.11 identisch. Aus diesem Grund wurden die Mittelwerte der relativen Luziferase mRNA und der relativen Luziferase Aktivität mit und ohne CCL5 3'UTR ohne Kotransfektion (Abbildungen A und B) aus den Versuchen der Abbildungen 4.8 bis 4.11 gemittelt. Die Mittelwerte und der \pm S.E.M. resultieren daher aus 18 unabhängigen Experimenten. Irrtumswahrscheinlichkeit: *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$.

Ausgangspunkt der Beschreibung dieses Versuches ist der destabilisierende Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA.

P38Y182F alleine verändert den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die relative Luziferase mRNA nicht (Abbildung 4.11 A) und auch die Luziferaseaktivität bleibt unverändert (Abbildung 4.11 B). Durch Bildung des Verhältnisses CCL5 3'UTR zu EMPTY zeigt sich ein Wert um Eins für die Luziferase mRNA (Abbildung 4.11 C) und für die Luziferaseaktivität (Abbildung 4.11 D). Die Kotransfektion von TAB1 zu p38Y182F hebt den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA leicht auf (Abbildung 4.11 A), was sich auch in einer leicht gesteigerten Luziferase Aktivität und somit Translation des Luziferase Proteins zeigt (Abbildung 4.11 B). Die Bildung des Verhältnisses CCL5 3'UTR zu EMPTY verdeutlicht die Stabili-

sierung der Luziferase mRNA durch p38Y182F mit TAB1 (Abbildung 4.11 C). Diese Stabilisierung der Luziferase mRNA führt zu einer gesteigerten Luziferaseaktivität (Abbildung 4.11 D).

Wie in den vorangegangenen Versuchen kann TAB1 Δ S mit p38YF, am ehesten unabhängig von p38Y182F, den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA minimal aufheben, was zu einer gesteigerten Luziferase Aktivität und somit Translation des Luziferase Proteins führt (Abbildung 4.11 A und B). Nach Bildung des Verhältnisses von 3'UTR zu EMPTY zeigt sich die leichte Stabilisierung der Luziferase mRNA (Abbildung 4.11 C) und des Luziferaseproteins (Abbildung 4.11 D) etwas deutlicher. Der TAB1 Δ S Effekt dieses Experiments ist vergleichbar mit der Stabilisierung durch TAB1 Δ S alleine (Abbildung 4.8). Die relative Luziferase mRNA (Abbildung 4.11 A) und die relative Luziferase Aktivität (Abbildung 4.11 B) zeigen vergleichbare Ergebnisse, wobei aufgrund der größeren Fehler (\pm S.E.M.) durch Schwankungen in den Real-Time PCR Versuchen die Aussagen auf mRNA Ebene leicht eingeschränkt sind.

Zusammengefasst hatte p38YF alleine keinen Effekt auf den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA. Nach Translation zeigte sich mit p38YF alleine auch kein Effekt auf die Luziferaseaktivität. P38YF mit TAB1 stabilisierte die Luziferase mRNA durch Einfluss auf die CCL5 3'UTR, aber schwächer als p38 mit TAB1. **P38YF lässt sich im Gegensatz zu p38TA noch durch TAB1 aktivieren. Dabei ist der stabilisierende Effekt von p38YF und TAB1 schwächer als der stabilisierende Effekt von p38 und TAB1.** TAB1 Δ S stabilisierte die Luziferase mRNA mit geringer Intensität, wie in den vorherigen Versuchen, ebenfalls.

4.3.5 Einfluss von IL-1 auf die Stabilität der CCL5 3'UTR in A549 Zellen

Die Eingangsexperimente dieser Arbeit zeigten, dass IL-1 zur Expression von endogenem CCL5 in A549 Zellen führte. In diesen Experimenten wurden Kinetiken über 24 Stunden angefertigt, die für CCL5 mRNA, intrazelluläres CCL5 Protein und sekretiertes CCL5 Protein sehr gut reproduzierbare Verläufe zeigten.

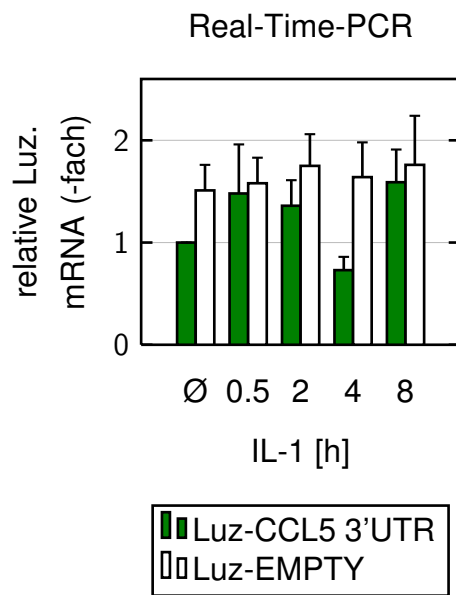
Aus Vorversuchen war bekannt, dass TAB1 essentiell für die IL-1 induzierte CCL5 Sekretion ist [53]. Auch von p38 war bekannt, dass es für die CCL5 Expression wichtig ist, wobei die CCL5 Transkription nicht von p38 beeinflusst wurde [117]. Die Aktivität von p38 war nicht von TAB1 abhängig [6], [52]. Daraus entstand die Hypothese, dass

TAB1 innerhalb der IL-1 Signalkaskade p38 nachgeschaltete Schritte transkriptionell oder posttranskriptionell regulieren könnte.

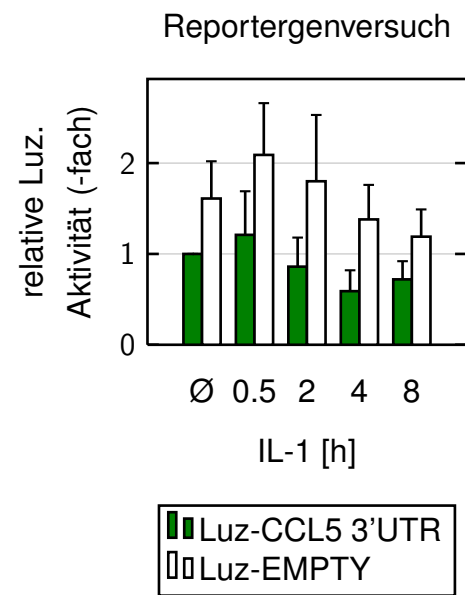
In den bisherigen Experimenten dieser Arbeit stabilisierten p38 und TAB1 die Luziferase mRNA posttranskriptionell.

Die bisherigen Versuche wurden mit überexprimiertem TAB1 und p38 durchgeführt. Da auch der physiologische Stimulus IL-1 zu einer Phosphorylierung von TAB1 und von p38 führt, untersucht der nachfolgende Versuch, ob die Stabilisierung der CCL5 mRNA von p38 und TAB1 IL-1 abhängig ist bzw. andere IL-1 abhängige Proteine innerhalb der Kaskade Einfluss auf die CCL5 3'UTR haben (Abbildung 4.12).

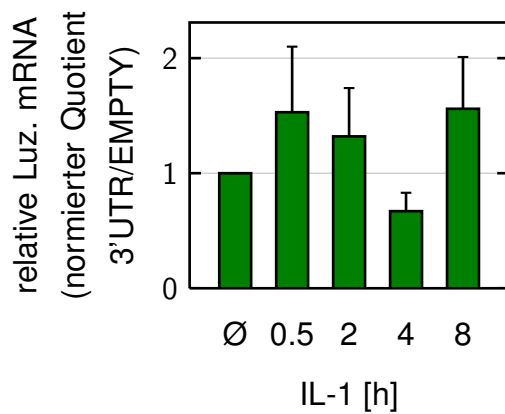
(A)



(B)



(C)



(D)

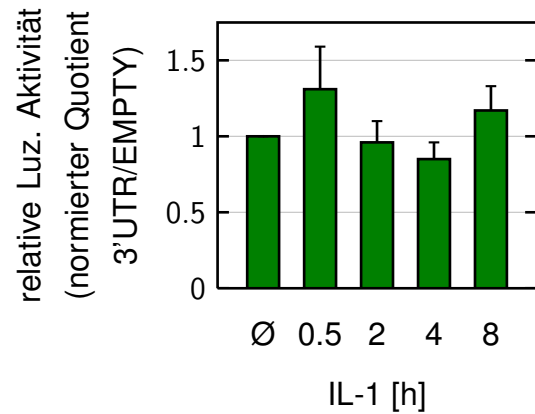


Abbildung 4.12: Der destabilisierende Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA kann durch IL-1 nicht aufgehoben werden.

A549 Zellen wurden in 2-Löcher/Ansatz einer 6-Lochplatte ausgesäht. Zellen wurden pro Loch mit 100ng pSG-CCL5-3'UTR oder 100ng des Kontrollvektors pSG-EMPTY jeweils zusammen mit 750ng SV-40- β -Gal transient transfiziert. Die Zellen blieben unbeeinflusst oder

wurden für 0,5, 2, 4 oder 8 Stunden mit IL-1 (10ng/ml) stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen der 2-Löcher/Ansatz gemeinsam geerntet und anschließend in zwei Hälften geteilt. Aus der ersten Hälfte wurde die gesamte RNA extrahiert und die Luziferase mRNA in der Real-Time PCR bestimmt. Die zweite Hälfte wurde lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Luziferaseaktivität und die Luziferase mRNA wurden auf die β -Galaktosidaseaktivität normiert.

In Abbildung A ist die relative Luziferase mRNA Expression und in Abbildung B die relative Luziferaseaktivität mit und ohne CCL5 3'UTR dargestellt. Der Wert der Luziferase-CCL5 3'UTR ohne IL-1 Stimulation wurde auf 1 gesetzt und die anderen Werte hierzu in Verhältnis gesetzt. In den Abbildungen C und D sind die Messwerte aus den Abbildungen A und B auf die Kontrolle pSG-EMPTY normiert dargestellt. Werte der Abbildung C werden aus Werten der Abbildung A berechnet. Werte der Abbildung D werden aus Werten der Abbildung B berechnet. Hierzu werden zunächst die Quotienten Luz-CCL5 3'UTR/Luz-EMPTY gebildet. Der Quotient Luz-CCL5 3'UTR/Luz-EMPTY ohne IL-1 Behandlung wird auf 1 gesetzt und die anderen Quotienten in Verhältnis gesetzt. Ein ansteigender Wert bedeutet einen reduzierten destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR im Verhältnis zum EMPTY Kontrollvektor.

Die Messwerte der Abbildungen A-D sind als Mittelwerte \pm S.E.M. gezeigt. Bei den Real-Time-PCR Versuchen resultieren Mittelwerte und \pm S.E.M. aus 5 unabhängigen Experimenten. Bei den Reporterergenversuchen resultieren Mittelwerte und \pm S.E.M. aus 4 unabhängigen Experimenten. Irrtumswahrscheinlichkeit: *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$.

In der unstimulierten Probe zeigt sich der destabilisierende Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA. Nach Translation der Luziferase mRNA bleibt die Luziferaseaktivität von CCL5 3'UTR gegenüber EMPTY vermindert (Abbildung 4.12 A und B). Die Verhältnisse 3'UTR zu EMPTY bleiben nach der IL-1 Stimulation über den Zeitraum von 0,5 bis 8 Stunden gleich. Dementsprechend zeigen die Werte für die relative Luziferase mRNA und für die relative Luziferaseaktivität keine signifikante Veränderung (Abbildung 4.12 C und D). Die Aktivierung der Signalkaskade durch IL-1 verändert den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR nicht.

Zusammenfassend beeinflusste die Stimulation mit IL-1 den destabilisierenden Einfluss der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA nicht.

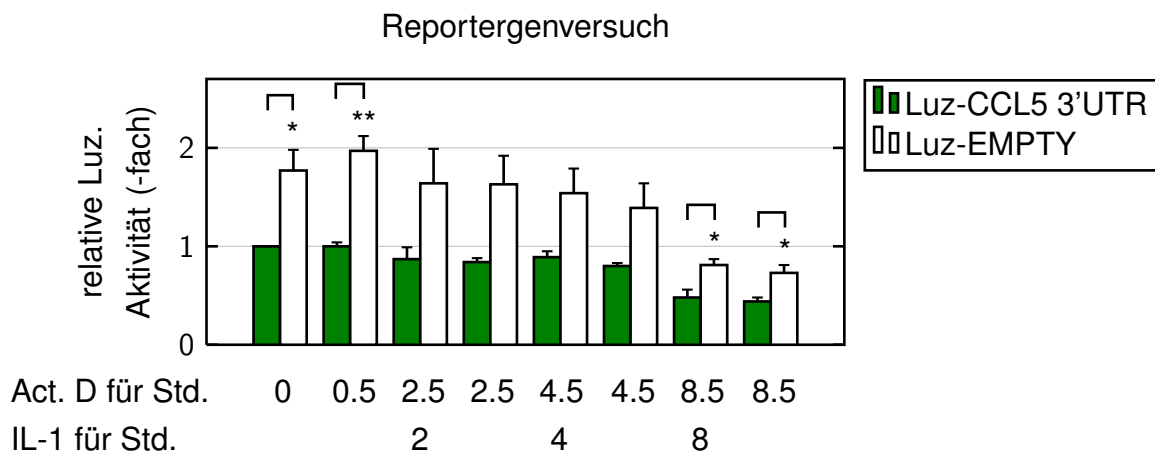
4.3.6 Einfluss von IL-1 auf die Stabilisierung der CCL5 3'UTR unter Actinomycin D in A549 Zellen

Ein möglicher Grund, dass kein IL-1 Effekt im vorherigen Versuch messbar war, ist die dauerhafte Neusynthese von Luziferase mRNA, bedingt durch die transfizierten CCL5 3'UTR oder EMPTY Plasmide, welche einen starken basalen Promotor tragen. Durch den starken basalen Promotor findet die Transkription der dem Promotor nachgeschalteten Luziferase des Plasmids dauerhaft auf einem hohen Level statt, so dass dauerhaft große Mengen Luziferase mRNA nachproduziert werden, was eventuelle Effekte auf die bereits intrazellulär vorhandene Luziferase mRNA in den nicht messbaren Hintergrund drängt.

Actinomycin D ist ein Inhibitor der Transkription. Actinomycin D interkaliert vor allem in GC-reiche Sequenzen, stabilisiert Topoisomerase-I DNA kovalente Komplexe und verhindert so das voranschreiten der RNA Polymerase. Wird Actinomycin D von kultivierten Zellen entfernt, erholt sich die Transkription nach einigen Stunden wieder [122]. Als Folge der Actinomycin D Behandlung wird weniger mRNA synthetisiert und die Proteinproduktion sinkt als Folge ab.

Im nachfolgenden Versuch wird die Neusynthese von mRNA durch Actinomycin D blockiert, wodurch mögliche posttranskriptionelle Einflüsse von IL-1 auf die CCL5 3'UTR stärker zur Geltung kommen könnten. Der Versuchsaufbau des nächsten Experimentes stimmt mit dem des vorigen Versuches (Abbildung 4.12) überein, hinzukommt die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Actinomycin D (Abbildung 4.13).

(A)



(B)

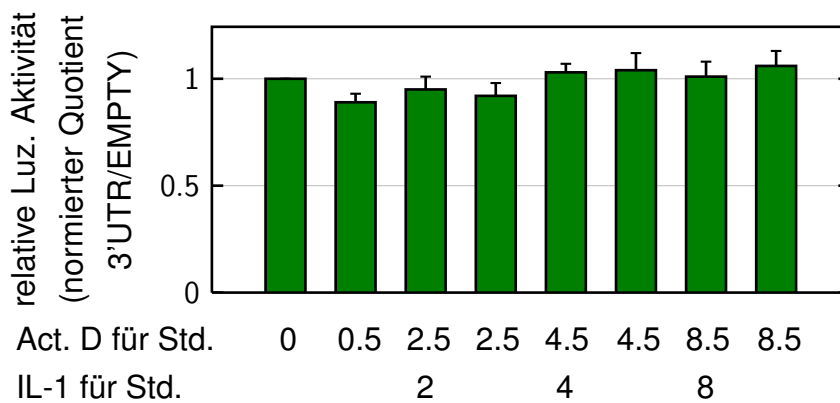


Abbildung 4.13: Der destabilisierende Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA ist nicht durch IL-1 beeinflussbar.

A549 Zellen wurden in 1-Loch/Ansatz einer 6-Lochplatte ausgesäht. Zellen wurden pro Loch mit 10ng pSG-CCL5-3'UTR oder 10ng des Kontrollvektors pSG-EMPTY jeweils zusammen mit 750ng SV-40- β -Gal transient transfiziert. Die Zellen blieben unbeeinflusst oder wurden für 0.5, 2.5, 4.5 oder 8.5 Stunden mit Actinomycin D (10 μ g/ml) behandelt. Nach 30 Minuten wurden die Zellen zusätzlich mit IL-1 (10ng/ml) behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet. Die Zellen wurden lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Luziferaseaktivität wurde auf die β -Galaktosidaseaktivität normiert.

In Abbildung A ist die relative Luziferaseaktivität mit und ohne CCL5 3'UTR dargestellt. Der Wert der Luziferase-CCL5 3'UTR ohne Actinomycin D Behandlung und ohne IL-1 Stimulation wurde auf 1 gesetzt und die anderen Werte hierzu in Verhältnis gesetzt.

In Abbildung B sind die Messwerte aus Abbildung A auf die Kontrolle pSG-EMPTY normiert dargestellt. Werte der Abbildung B werden aus Werten der Abbildung A berechnet. Hierzu werden zunächst die Quotienten Luz-CCL5 3'UTR/Luz-EMPTY gebildet. Der Quotient Luz-CCL5 3'UTR/Luz-EMPTY ohne Actinomycin D Behandlung und ohne IL-1 Behandlung wird auf 1 gesetzt und die anderen Quotienten in Verhältnis gesetzt. Ein ansteigender Wert bedeutet einen reduzierten destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR im Verhältnis zum EMPTY Kontrollvektor.

Die Messwerte der Abbildungen A und B sind als Mittelwerte \pm S.E.M. gezeigt. Die Mittelwerte und der \pm S.E.M. resultieren aus 3 unabhängigen Experimenten.

Irrtumswahrscheinlichkeit: *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$.

In der unstimulierten Probe zeigt sich wie in den vorangegangenen Versuchen der destabilisierende Effekt der CCL5 3'UTR, der in einer reduzierten Luziferaseaktivität von CCL5 3'UTR zu EMPTY zum Ausdruck kommt. Unter dem Einfluss von Actinomycin D findet eine stark verringerte mRNA Neusynthese statt. Dadurch wird in diesem Versuch weniger Luziferase mRNA gebildet und in der Folge weniger Luziferaseprotein produziert, weswegen die relative Luziferaseaktivität über die dargestellte Zeit von 8,5 Stunden im Reportergenversuch abfällt (Abbildung 4.13 A). Wird das Verhältnis aus CCL5 3'UTR zu EMPTY gebildet, zeigt sich über die Zeit von 8,5 Stunden ein Wert um Eins (Abbildung 4.13 B). Ein Wert um Eins bedeutet, dass CCL5 3'UTR zu EMPTY in gleichem Verhältnis zueinander abfallen und daher die Verhältnisse CCL5 3'UTR zu EMPTY gleich (um Eins) bleiben. Die Stimulation mit IL-1 hat keinen Einfluss auf den destabilisierende Effekt der CCL5 3'UTR (Abbildung 4.13 B). Nicht gezeigt ist die relative Luziferase mRNA, da diese Versuche mit einem hohen Fehler behaftet waren und keine Interpretation zuließen.

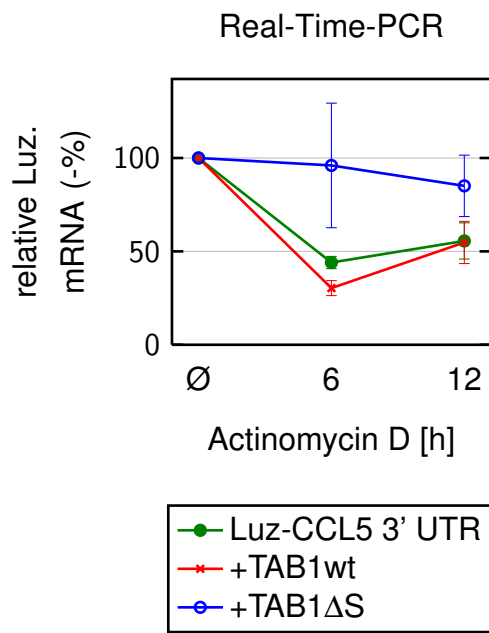
Ebenfalls nicht abgebildet ist ein Vorversuch zu diesem, der mit 5 μ g/ml Actinomycin D durchgeführt wurde. Bei der Behandlung mit 5 μ g/ml Actinomycin D war der Abfall der Luziferase mRNA und der Luziferaseaktivität sehr gering, so dass hier immer noch eine hohe Menge Luziferase mRNA transkribiert wurde. Um die Transkription stärker zu blockieren und einen deutlicheren Abfall zu induzieren, erhöhten wir die Dosis Actinomycin D auf 10 μ g/ml. Dies führte zu dem in Abbildung 4.13 A gezeigten stärkeren Abfall der Luziferaseaktivität.

4.3.7 Regulation der CCL5 3'UTR durch TAB1 und TAB1 Δ S unter dem Einfluss von Actinomycin D in A549 Zellen

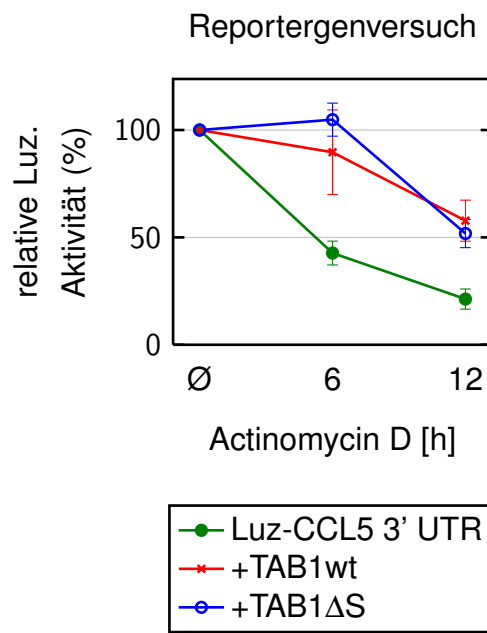
In Abbildung 4.8 konnte gezeigt werden, dass die Deletion der Serine 452-457 von TAB1 den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA in A549 Zellen aufhebt. Somit stabilisierte TAB1 Δ S die Luziferase-CCL5-3'UTR mRNA.

Eine weitere Möglichkeit den stabilisierenden Effekt von TAB1 Δ S auf die CCL5 3'UTR zu zeigen besteht durch die Actinomycin D induzierte Inhibierung der mRNA Neusynthese und dem daraus resultierenden Abfall der Luziferase-CCL5-3'UTR mRNA, der durch TAB1 reguliert werden kann. Deshalb wurden A549 Zellen für 6 und 12 Stunden mit Actinomycin D behandelt, in An- oder Abwesenheit von überexprimiertem TAB1 oder TAB1 Δ S (Abbildung 4.14).

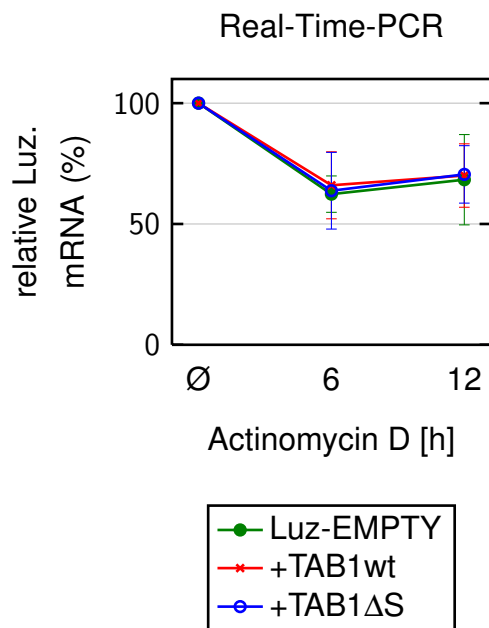
(A)



(B)



(C)



(D)

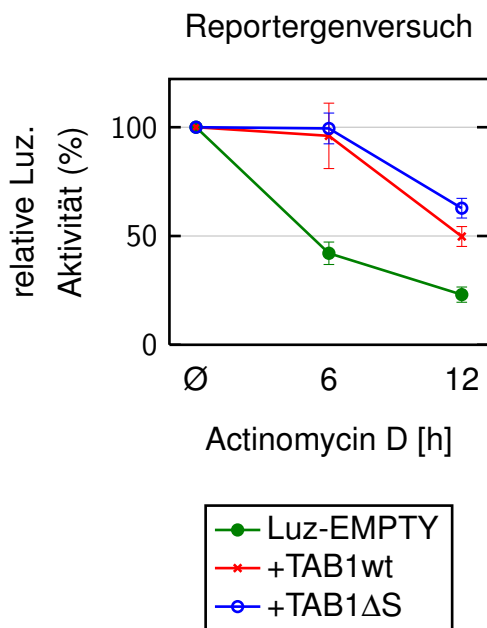


Abbildung 4.14: TAB1ΔS vermindert den Actinomycin D induzierten Abfall der Luziferase-CCL5 3'UTR mRNA.

A549 Zellen wurden in 2-Löcher/Ansatz einer 6-Lochplatte ausgesäht. Zellen wurden pro Loch mit 10ng pSG-CCL5-3'UTR oder 10ng des Kontrollvektors pSG-EMPTY jeweils zusammen mit 750ng SV-40- β -Gal transient transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen pro Loch mit 1,5 μ g MYC-TAB1wt (MYC-TAB1 Wildtyp) oder mit 1,5 μ g MYC-TAB1 Δ S kotransfiziert. Die Zellen blieben unbeeinflusst oder wurden für 6 oder 12 Stunden mit Actinomycin D (10 μ g/ml) behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen der 2-Löcher/Ansatz gemeinsam geerntet und anschließend in zwei Hälften geteilt. Aus der ersten Hälfte wurde die gesamte RNA extrahiert und die Luziferase mRNA in der Real-Time PCR bestimmt. Die zweite Hälfte wurde lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Luziferaseaktivität und die Luziferase mRNA wurden auf die β -Galaktosidaseaktivität normiert.

In Abbildung A ist die relative Luziferase mRNA Expression und in Abbildung B die relative Luziferaseaktivität mit CCL5 3'UTR dargestellt. Die Werte der Luziferase-CCL5 3'UTR ohne Actinomycin D und mit Leervektorkontrolle, TAB1 oder TAB1 Δ S wurden auf 100% gesetzt und die anderen mit Actinomycin D behandelten Werte jeweils in Verhältnis gesetzt.

In Abbildung C ist die relative Luziferase mRNA Expression und in Abbildung D die relative Luziferaseaktivität des Kontrollvektors (EMPTY) dargestellt. Die Werte der Luziferase-CCL5 3'UTR ohne Actinomycin D und ohne TAB1 oder ohne Actinomycin D mit TAB1 oder ohne Actinomycin D mit TAB1 Δ S Behandlung wurden auf 100% gesetzt und die anderen Werte jeweils in Verhältnis gesetzt.

Die Halbwertszeiten wurden berechnet, indem zuerst eine Regressionskurve $f(x) = c * e^{-\lambda}$ berechnet wurde. Anschließend erfolgte das Einsetzen von λ in $T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda}$.

Die Messwerte der Abbildungen A-D sind als Mittelwerte \pm S.E.M. gezeigt. Bei den Real-Time-PCR Versuchen und den Reportergenversuchen resultieren Mittelwerte und \pm S.E.M. aus 4 unabhängigen Experimenten. Irrtumswahrscheinlichkeit: *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$.

Die Abbildungen 4.14 A und C zeigen den relativen Abfall der Luziferase mRNA unter dem Einfluss von Actinomycin D über 6 und 12 Stunden. In Abbildung 4.14 A ist der Einfluss von TAB1 oder TAB1 Δ S auf die Luziferase-CCL5 3'UTR mRNA abgebildet und in Abbildung 4.14 C der Einfluss von TAB1 oder TAB1 Δ S auf die Luziferase-EMPTY mRNA abgebildet. Die Kinetiken der Luziferase mRNA (EMPTY) mit und ohne TAB1 oder TAB1 Δ S verlaufen identisch. Somit haben TAB1 oder TAB1 Δ S keinen Einfluss auf die Luziferase mRNA nach Blockieren der mRNA Neusynthese mit Actinomycin D (Abbildung 4.14 C). In der Kinetik der relativen Luziferase mRNA zeigt die Luziferase-CCL5 3'UTR mit TAB1 Δ S einen deutlich geringeren Abfall im Vergleich zu Luziferase-CCL5 3'UTR alleine oder im Vergleich zu Luziferase-CCL5 3'UTR mit

TAB1. TAB1 Δ S vermindert den durch Actinomycin D induzierten Abfall der Luziferase CCL5 3'UTR mRNA (Abbildung 4.14 A).

Die Abbildungen 4.14 B und D zeigen den relativen Abfall der Luziferaseaktivität unter dem Einfluss von Actinomycin D über 6 und 12 Stunden. In Abbildung 4.14 B ist der Einfluss von TAB1 oder TAB1 Δ S auf die Luziferaseaktivität bei transfiziertem Luziferase-CCL5 3'UTR Plasmid abgebildet und in Abbildung 4.14 D der Einfluss von TAB1 oder TAB1 Δ S auf die Luziferaseaktivität bei transfiziertem Luziferase (EMPTY) Plasmid. Bei dem Vergleich der Kinetiken der Luziferaseaktivität mit und ohne CCL5 3'UTR zeigen sich fast identische Verläufe. Die Luziferaseaktivität fällt am stärksten ohne TAB1 oder TAB1 Δ S ab. TAB1 und TAB1 Δ S können den Abfall der Luziferaseaktivität mit (Abbildung 4.14 B) und ohne (Abbildung 4.14 D) CCL5 3'UTR verringern. Der TAB1 und der TAB1 Δ S Effekt sind daher unabhängig von der CCL5 3'UTR.

Eine zusätzliche Möglichkeit zur Veranschaulichung des TAB1 Δ S Effektes auf die Luziferase CCL5 3'UTR liefert der Vergleich von Halbwertszeiten (aus Abbildung 4.14 A). Die Halbwertszeit für die Luziferase-CCL5 3'UTR mRNA alleine beträgt 14,17 Stunden. Die Halbwertszeit für die Luziferase-CCL5 3'UTR mRNA mit TAB1 beträgt 13,81 Stunden. Und die Halbwertszeit für die Luziferase-CCL5 3'UTR mRNA mit TAB1 Δ S beträgt 51,47 Stunden. Die durch TAB1 Δ S deutlich verlängerte Halbwertszeit der Luziferase-CCL5 3'UTR mRNA verdeutlicht den Effekt des verminderten Abfalls der Luziferase-CCL5 3'UTR mRNA durch TAB1 Δ S.

Zusammengefasst vermindert TAB1 Δ S den Actinomycin D induzierten Abfall der Luziferase-CCL5 3'UTR mRNA. Der stabilisierende Effekt von TAB1 Δ S auf die CCL5 3'UTR lässt sich nur auf mRNA Ebene deutlich zeigen. Auf Proteinebene, durch Messung der Luziferaseaktivität, ist kein Effekt messbar.

5 Diskussion

Entzündung ist ein entscheidender Faktor für die Erhaltung der Integrität des menschlichen Körpers. Bei der Abwehr vor Krankheitserregern oder bei der Heilung von Wunden wird die Entzündungskaskade aktiviert und trägt entscheidend zur Wiederherstellung des Gewebes bei. Bei Fehlregulationen der fein regulierten Entzündungsreaktion drohen Krankheit, Sepsis und Tod. Einen Teil dieser feinen Regulation der Entzündungskaskade zu entschlüsseln war das Ziel dieser Arbeit.

Das Chemokin CCL5 ist an Entzündungsreaktionen und einer Vielzahl von Entstehungen und Erhaltungen von Erkrankungen beteiligt [70], [71], [72], [73], [74], [75], [76], [77], [78] und [79]. Bisher vorhandene Therapeutika wie Glukokortikoide oder IL-1 Rezeptorantagonisten unterdrücken die Entzündungsantwort sehr wirkungsvoll. Im Fall der Glukokortikoide aber weitgehend unspezifisch. Die neueren IL-1 Rezeptorantagonisten wirken bereits deutlich spezifischer. Therapeutische Eingriffe in die Regulation von Effektorchemokinen wie CCL5 könnten die Entzündungsreaktion nochmals spezifischer und feiner in die therapeutisch gewünschte Richtung modulieren.

Wolf et al. zeigten, dass die Sekretion von CCL5 in Mef Zellen von TAB1 abhängig ist [53]. Experimente aus der Literatur zeigten, dass TAB1 Knockout Mef Zellen im Vergleich zu TAB1 Wildtyp Mef Zellen keine Änderung der Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF-kappaB und AP-1 zeigten [6]. Des Weiteren führte das Fehlen von TAB1 in der Folge zu keiner IL-1 induzierbaren Änderung von p38, JNK oder NF-κB [50], [51], [6], [52] und [53]. Aus dem fehlenden transkriptionellen Einfluss von TAB1 entstand die Hypothese der posttranskriptionellen Regulation durch TAB1, der die verminderte CCL5 Sekretion der TAB1 Knockout Mef Zellen im Vergleich zu TAB1 Wildtyp Mef Zellen erklärt. Da p38 unabhängig von der MAPK-Kaskade durch Autophosphorylierung nach Interaktion mit TAB1 aktiviert werden kann [26] und die Stimuli sowie die transkriptionellen oder posttranskriptionellen Auswirkungen, die diese MAPK-Kaskade unabhängige Aktivierung von p38 bewirken, bisher unbekannt sind werden sie in dieser Arbeit untersucht.

Darüber hinaus stellte sich die Frage nach der Funktion der neu identifizierten Phos-

phorylierungsstellen der Aminosäuren 452-457 von TAB1 [53]. In Mef Zellen führte die Deletion der Serine 452-457 zu einer erhöhten CCL5 Sekretion nach IL-1 Stimulation im Vergleich mit TAB1wt ([53], Figure 6D). Auf die Aktivität von TAK1 hatten die Serine 452-457 keine entscheidende Bedeutung ([53], Figure S3). Dementsprechend war der Effekt der Serine 452-457 von TAB1 ebenfalls MAPK-Kaskade unabhängig zu untersuchen. Da von p38 posttranskriptionelle Einflüsse bekannt sind [42] wurde der Fokus für die zu untersuchenden Effekte auf die MAPK-Kaskade unabhängige Aktivierung von p38 durch TAB1 gelegt. Hierbei wurden Effekte der durch TAB1 induzierten Autophosphorylierung an Threonin180 und an Tyrosin182 von p38 und der durch p38 phosphorylierten Serine 452-457 von TAB1 untersucht [53] (Abbildung 5.1).

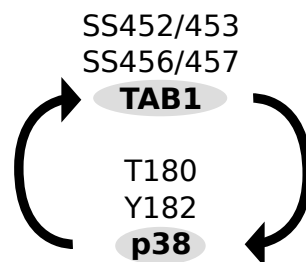


Abbildung 5.1: Wechselseitige Phosphorylierung und Aktivierung von p38 und TAB1.

P38 wird MAPK-Kaskade unabhängig nach Interaktion mit TAB1 durch Autophosphorylierung an T180 und Y182 aktiviert. Zusätzlich werden die Phosphorylierungsstellen des Serinclusters 452-457 von TAB1 durch p38 phosphoryliert und sind die Voraussetzung für die TAB1 induzierte Autophosphorylierung von p38. Modifiziert nach [53], Figure 4D.

Dabei wird ein moderner Ansatz bei der Untersuchung der feinen Regulation der Entzündungskaskade verfolgt. Untranslatierte Bereiche (UTR) der mRNA regulieren die mRNA Stabilität, den Export ins Zytoplasma, die subzelluläre Lokalisation und die Translationseffizienz. Durch diese Mechanismen wird die synthetisierte Proteinmenge beeinflusst [123]. Unterschieden werden die 5'UTR und die 3'UTR einer mRNA. Die 5'UTR befindet sich 5'wärts der zugehörigen mRNA und die 3'UTR 3'wärts der zugehörigen mRNA. Auch das Chemokin CCL5 ist mit einer 5'UTR und einer 3'UTR ausgestattet. Diese Arbeit untersucht Effekte der CCL5 3'UTR auf die Transkription, die mRNA Stabilität und die Translation des CCL5 Gens. In diesem Zusammenhang werden die Einflüsse von TAB1 und p38 auf die CCL5 3'UTR untersucht. P38 und TAB1 sind Bestandteile der IL-1 Entzündungskaskade. IL-1 ist ein zentraler Vermittler von Entzündungsreaktionen, bei denen unter anderem über Regulationen von TAB1 und p38 CCL5 produziert wird. CCL5 wiederum gehört zur Gruppe der Effektorchemokine, die für die Entzündungsantwort verantwortlich sind.

A549 und HeLa tTA Zellen zeigen eine starke IL-1 induzierbare CCL5 Expression.

Nach der Etablierung der Versuchsbedingungen zeigten die ersten Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine hohe Menge CCL5 von A549 Zellen (humane alveoläre Epithelzellen eines Adenokarzinoms) und von einer HeLa Zelllinie (humane epitheloide Cervix-Carcinom Zelllinie) nach IL-1 Stimulation gebildet wurde (Abbildung 4.1 und 4.2). Aus der Literatur ist seit 2002 bekannt, dass CCL5 in alveolären Epithelzellen nach Stimulation mit Zytokinen gebildet wird [124]. In einem klinischen Kontext wurde später gezeigt, dass Patienten mit atopischem Asthma erhöhte Serum CCL5 Spiegel im Vergleich zu einer Kontrollgruppe aufweisen [125]. Ebenfalls erhöht ist die CCL5 mRNA in Lungenproben von Patienten mit pulmonal arterieller Hypertonie verglichen mit Kontrollpatienten [82].

Zusätzlich zeigte sich in dieser Arbeit, dass A549 Zellen CCL5 nur nach IL-1 Stimulation und nicht nach TNF Stimulation sekretierten (Abbildung 4.3), was einen IL-1 spezifischen Signalweg für die CCL5 Expression in A549 Zellen nahelegt.

In dem untersuchten zeitlichen Verlauf der CCL5 Expression nach IL-1 Stimulation in A549 Zellen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit bei dauerhafter IL-1 Stimulation den Höhepunkt der mRNA Expression bei 4 Stunden (Abbildung 4.4). In der Literatur (Einleitung Kapitel 1.7.2) wurde die Stabilität der CCL5 mRNA nach TNF Stimulation der Gruppe III mit einem Höhepunkt der mRNA Expression nach 12 Stunden zugeordnet [87]. Hao und Baltimore teilten die mRNA Stabilität von TNF aktivierten Genen in MEF Zellen in drei Gruppen mit unterschiedlichen Induktionskinetiken ein (Einleitung Abbildung 1.6). Die Expressionskinetiken der Gruppen I sind durch den Höhepunkt der mRNA Expression 0,5 Stunden nach TNF Stimulation, die der Gruppe II nach 2 Stunden und der Gruppe III nach 12 Stunden charakterisiert [87]. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die CCL5 mRNA Expression in A549 Zellen nach IL-1 Stimulation eher zu Gruppe II mit einem Höhepunkt der mRNA Expression bei 2 bis 4 Stunden zuzuordnen ist.

Transkriptionelle Regulation des Chemokins CCL5 durch den TAB1-p38 Signalweg.

Um die Regulation des Chemokins CCL5 auf Ebene der Transkription zu untersuchen wurden Versuche mit dem CCL5 Promotor durchgeführt. In dieser Arbeit wurde ein

Konstrukt eingesetzt, bei dem der CCL5 Promotor ein Luziferasegen kontrolliert (Abbildung 5.2). In den anschließend durchgeführten Reporterergenversuchen wurde die Luziferaseaktivität nach der Translation des Luziferasegens gemessen.

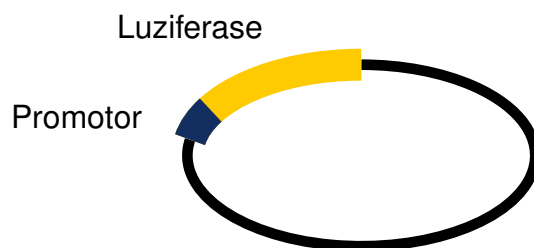


Abbildung 5.2: CCL5 Promotor Reportergenkonstrukt. Bei dem CCL5 Promotor Reportergenassay wird ein Plasmid eingesetzt, welches den CCL5 Promotor trägt, der das Luziferasegen kontrolliert. Modifiziert nach SwitchGear Genomics.

Da humane und murine Zellen kein Luziferasegen exprimieren, bietet die Messung der Luziferaseaktivität den Vorteil, dass es keine Messung von Luziferase im Hintergrund gibt, die die Messergebnisse beeinflussen könnte. In den Versuchen dieser Arbeit konnte MEKK1 im Sinne einer Positivkontrolle den CCL5 Promotor aktivieren. IL-1 (10ng/ml), TNF- α (20ng/ml) oder IFN- γ (100ng/ml) hatten in den von uns eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf den CCL5 Promotor. Ebenfalls keinen Einfluss auf den CCL5 Promotor hatten p38, TAB1 und die Deletionsmutante TAB1 Δ S. In den Versuchen der Literatur von Brasier et al., die ebenfalls in A549 Zellen durchgeführt wurden, ist der CCL5 Promotor gut durch TNF- α (100ng/ml) und IFN- γ (100IU/ml) stimulierbar [124], [85]. Da wir das in dieser Arbeit eingesetzte Konstrukt mit dem CCL5 Promotor Reportergenkonstrukt von Prof. Brasier durchführten, lassen sich die Versuche gut vergleichen. Mögliche Gründe für den fehlenden Einfluss von TNF- α oder IFN- γ in den Versuchen dieser Arbeit sind die eingesetzten Konzentrationen, die in dieser Arbeit deutlich niedriger waren, sowie andere Zellen und andere Versuchsbedingungen.

Posttranskriptionelle Regulation des Chemokins CCL5 durch den TAB1-p38 Signalweg.

Da TAB1 in diesem Assay die CCL5 Genexpression nicht auf transkriptioneller Ebene regulierte, wurde in den nachfolgenden Experimenten untersucht, ob TAB1 die CCL5 Genexpression posttranskriptionell reguliert .

Um die Regulation des Chemokins CCL5 auf posttranskriptioneller Ebene zu untersuchen wurden Versuche mit dem CCL5 3'UTR Reportergenkonstrukt durchgeführt. Hierfür wurde ein Konstrukt eingesetzt, in dem die CCL5 3'UTR mit der Luziferase cDNA und einem konstitutiv aktiven Promotor verknüpft sind (Abbildung 5.3).

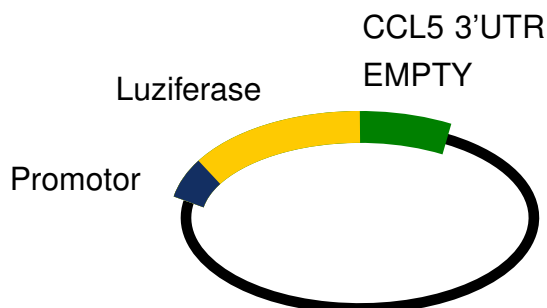


Abbildung 5.3: CCL5 3'UTR Reportergenkonstrukt. Bei dem CCL5 3'UTR Reportergenassay werden zwei verschiedene Plasmide (EMPTY und CCL5 3'UTR) eingesetzt. Beide Plasmide tragen den identischen basalen (sehr aktiven) Promotor und das identische Luziferasegen. Der Unterschied zwischen den Vektoren ist die 3'UTR, an dessen Stelle entweder die CCL5 3'UTR oder EMPTY (also keine 3'UTR) liegt. Der EMPTY Vektor dient der Normierung, welche einen besonders hohen Stellenwert hat, um spezifische CCL5 3'UTR Effekte zu messen. Modifiziert nach SwitchGear Genomics.

In den anschließend durchgeführten Versuchen wurde die Luziferase mRNA in Real-Time-PCR Versuchen bestimmt und die Luziferaseaktivität nach der Translation des Luziferasegens in Reportergenversuchen gemessen.

Der Aufbau des CCL5 3'UTR Reportergenkonstruktes macht deutlich, dass bei diesem Konstruktaufbau Effekte der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA gemessen werden und nicht direkt auf die CCL5 mRNA. Interpretationen dieser Arbeit im Bezug auf die Einflüsse der CCL5 3'UTR auf die CCL5 mRNA sind somit versuchsbedingt Rückschlüsse aus der Regulation der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA. Die CCL5 mRNA und die CCL5 5'UTR könnten selbst Teil eines Regulationsmechanismus sein, was in dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Die Verwendung eines Konstruktes, welches die CCL5 mRNA sowie die CCL5 5'UTR und CCL5 3'UTR beinhaltet stellt einen Ansatz für weiterführenden Experimente dar.

In den Versuchen dieser Arbeit zeigte sich in allen Versuchen, bei denen die CCL5 3'UTR nachgeschaltet war eine etwa 2-3 fache Reduktion von Luziferase mRNA und Luziferase Protein. Dies bedeutet, dass die CCL5 3'UTR inhibitorischen Einfluss hat und der hier verwendete Assay geeignet ist um den Einfluss von p38 und TAB1 auf die Regulation der mRNA Stabilität zu untersuchen.

Transfektionsstress beeinflusst möglicherweise die CCL5 3'UTR.

Allgemein ist zu beachten, dass der Vorgang der Transfektion Stress für Zellen bedeutet. Im Bezug auf die in dieser Arbeit verwendeten CCL5 3'UTR Konstrukte, die mit einer leeren Kontrolle (Empty) verglichen werden, könnte bereits der durch die Transfektion hervorgerufener Zellstress die CCL5 3'UTR beeinflussen. Die Beeinflussung könnte eine Stabilisierung oder eine Destabilisierung der vorgeschalteten Luziferase mRNA bedingen.

Die Rekonstitution von Mef TAB1 Knockout Zellen mit TAB1 oder TAB1 Δ S hat keinen Einfluss auf den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR.

Im Gegensatz zu den Versuchen von Wolf et al. [53] zeigten TAB1 Mef Zellen in dieser Arbeit keine IL-1 Responsivität mehr (Kapitel 4.1.2 und 4.3.1). Zusätzlich übten TAB1 und TAB1 Δ S keinen Einfluss auf die Stabilisierung der CCL5 3'UTR aus. Aus diesem Grund wurde die Mef Zelllinie für weitere Versuche verworfen. Mef TAB1 Knockout Zellen sind stabil mit TAB1 rekonstituiert, wobei in den Versuchen dieser Arbeit die TAB1 Spiegel innerhalb der unterschiedlichen Mef Zelllinien starke Schwankungen zeigten. Möglicherweise ist das TAB1 Gen an verschiedenen Stellen im Genom der Mef Zellen integriert, so dass aufgrund von Selektionsdruck und zufälliger Verteilung der Mef Zellen Unterschiede gemessen wurden, die von TAB1 unabhängig sind und auf andere möglicherweise durch die Integration in das Genom defekte Gene zurückzuführen sind.

Die Koexpression von TAB1, TAB1 Δ S, p38wt, p38TA und p38YF supprimiert die Expression der Luziferase-CCL5 3'UTR und der Luziferase-Empty in A549 Zellen zu gleichen Teilen.

Es folgten weitere Reportergenversuche mit Transfektion der Luziferase Konstrukte. Vor allem auf mRNA Ebene zeigte sich bei Koexpression von TAB1, TAB1 Δ S, p38wt, p38TA und p38YF eine gleichermaßen reduzierte Expression der Luziferase-CCL5 3'UTR und der Luziferase-Empty Konstrukte (Abbildungen 4.8 bis 4.11). Da sich dieser Effekt gleichermaßen bei beiden Konstrukten zeigt ist dieser expressionssupprimierende Effekt am ehesten durch Einfluss der koexprimierten Konstrukte auf den basalen Promotor der Luziferase Konstrukte bedingt. Auch aus diesem Grund hat die oben beschriebene Normierung (Kapitel 3.15) einen wichtigen Stellenwert.

Des Weiteren zeigten Liu et al. 2012 in Experimenten mit dem p38 Inhibitor SB 203580, dass p38 an der Supprimierung der CCL5 mRNA beteiligt ist. Dabei war das downstream von p38 befindliche Molekül MK2 für die CCL5 Hemmung notwendig [126].

Die Deletion der Aminosäuren 452-457 von TAB1 hebt den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA in A549 Zellen auf.

TAB1wt ist überwiegend im Zellkern lokalisiert. Im Gegensatz dazu ist TAB1 Δ S überwiegend im Zytosol lokalisiert ([53] Figure 5), in dem die Proteinsynthese und die Stabilisierung von mRNA stattfindet. Dies könnte dazu führen, dass mehr TAB1 für die Stabilisierung der Luziferase CCL5 3'UTR zur Verfügung steht, wodurch TAB1 Δ S einen stärkeren stabilisierenden Effekt als TAB1 auf die CCL5 3'UTR bewirkt (Abbildung 4.8 und 5.4).

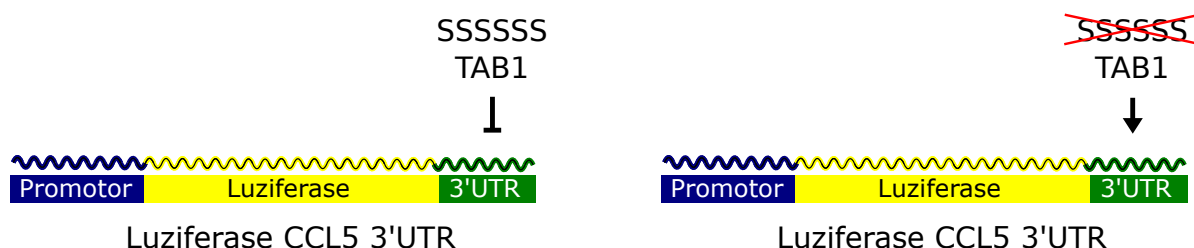


Abbildung 5.4: Die Deletion der Aminosäuren 452-457 von TAB1 hebt den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA in A549 Zellen auf. Die Expression von TAB1 kann den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR nicht aufheben. Die Deletionsmutante TAB1 Δ S, bei der die Serine 452-457 entfernt wurden hebt den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA nahezu vollständig auf.

Die Deletion der Serine 452-457 hat zur Folge, dass diese Aminosäuren als Phosphorylierungsstellen nicht mehr vorhanden sind. Zu diskutieren ist, ob die Phosphorylierung andere Proteine als Interaktionspartner zu TAB1 rekrutiert, oder ob die Phosphorylierung des Serinclusters zu anderen posttranslationalen Veränderungen führt. Sollte der Serincluster Teil einer Interaktionsdomäne sein, wäre es möglich, dass das Entfernen des Serinclusters, wie auch die Phosphorylierung des Serinclusters den Zugang zu den freien Serinen und damit die Interaktionsdomäne blockiert. Eine direkte Interaktion von TAB1 mit mRNA konnte bisher nicht nachgewiesen werden, aber auch die indirekte Interaktion mit Zwischenschaltung anderer Proteine, die mRNA regulieren wäre möglich. Das bedeutet, dass der Serincluster von

TAB1 direkt oder indirekt die Interaktion mit der Luziferase CCL5 3'UTR blockieren könnte. Oder die Serincluster-Interaktionsdomäne rekrutiert inhibitorische Proteine an die CCL5 3'UTR, weshalb nach Deletion oder Phosphorylierung der Serincluster-Interaktionsdomäne (Aminosäuren 452-457) der inhibitorisch (destabilisierende) Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA aufgehoben wird.

TAB1 induziert die p38 eingeleitete mRNA Stabilisierung von CCL5 in Abhängigkeit von den Serinen 452-457.

Die Autophosphorylierung von p38 an seinem TGY Motiv ist abhängig von dem Serincluster in TAB1 [53] (Figure 4 A). Diese Autophosphorylierung führt zu einer Aktivierung von p38, die die Stabilisierung der Luziferase CCL5 3'UTR zur Folge hat (Abbildung 4.9 und 5.4).

In den Versuchen dieser Arbeit wurden die neu identifizierten Phosphorylierungsstellen von TAB1 erstmalig in Bezug auf die p38 Autoaktivierung untersucht. Als Resultat wurde in dieser Arbeit eine neue physiologische Funktion der MAPK unabhängigen Aktivierung von p38 durch TAB1 gezeigt.

In einem klinisch relevanten Zusammenhang zeigten Tanno et al., dass die ischämische Aktivierung von p38 nach Myokardinfarkt in murinen Herzen auf der TAB1 assoziierten Autophosphorylierung basiert [127]. In Bezug auf die Regulation von CCL5 ist bekannt, dass die p38 MAP Kinase zumindest anteilig die CCL5 Produktion in bronchialen Epithelzellen reguliert [128].

Bisher nicht untersucht bleibt, ob der neu identifizierte Serincluster die weiteren in der Literatur bekannten Funktionen von p38-TAB1 beeinflusst.

T180 von p38 ist essentiell für die TAB1 induzierte Stabilisierung der CCL5 3'UTR.

P38T180A konnte mit oder ohne TAB1wt den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA nicht vermindern. Für die TAB1 induzierte Luziferase mRNA Stabilisierung durch p38 ist das T180 von p38 daher essentiell. Vor allem die bereits bekannte TAB1 induzierte Autophosphorylierung von p38 an T180 scheint hier für die Stabilisierung der Luziferase mRNA durch p38 und TAB1 bedeutsam.

Dementsprechend steht dieses Ergebnis in einem konsistenten Zusammenhang mit den Ergebnissen aus der Literatur, dass die Mutation von T180 von p38 zu einem vollständigen Verlust Aktivität von p38 führt [121], ([53], Figure 4 B).

Die Mutation von Y182 führt zu einer intermediär aktiven Form von p38, die durch TAB1 noch aktivierbar ist.

Bei der p38Y182F Mutante ist das Tyrosin zu Phenylalanin mutiert, wodurch die Autophosphorylierung von p38 und die Aktivität durch eine verschlechterte Substraterkennung stark reduziert sind [121]. Die Versuche dieser Arbeit mit der Y182F Mutante von p38 bestätigen, dass p38Y182F im Vergleich zu p38T180A durch TAB1 noch aktivierbar ist, jedoch schwächer als p38wt. Wolf et al. konnten weiterhin zeigen, dass p38YF koexprimiert mit TAB1wt an T180 stärker als p38wt phosphoryliert wird [53] (Figure 4 B). Zusätzlich sind bei stärkerer Autophosphorylierung an T180 von p38 die Serine 452, 453 und 456, 457 von TAB1 stärker phosphoryliert [53] (Figure 4 B). Trotz dieser verstärkten Phosphorylierung von p38 an T180 und von TAB1 an seinem Serincluster zeigte sich keine verstärkte Stabilisierung der Luziferase mRNA durch Einfluss auf die CCL5 3'UTR. Dies bestätigt die Bedeutung von Y182 in p38 als Substratbindungsstelle, die essentiell für die vollständige Funktion von p38 ist.

Ob der stabilisierende Effekt von p38Y182F mit TAB1 durch p38Y182F oder durch TAB1 hervorgerufen wird lässt sich folgendermaßen beantworten. TAB1 alleine (Abbildung 4.8) zeigte keinen stabilisierenden Effekt auf die CCL5 3'UTR. TAB1 mit p38 zeigte eine Stabilisierung der Luziferase mRNA (Abbildung 4.9). Und im Gegensatz zu TAB1 mit p38T180A (Abbildung 4.10) zeigte TAB1 mit p38Y182F (Abbildung 4.11) eine leichte Stabilisierung der Luziferase mRNA. P38, p38TA oder p38YF alleine hatten keinen Effekt (Abbildung 4.9, 4.10 und 4.11). **Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Verminderung bzw. Aufhebung des destabilisierenden Effektes der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA ein p38 bedingter Effekt ist, der durch TAB1 induziert wird.**

Zusammenfassung des Einflusses von p38 und TAB1 auf die CCL5 3'UTR.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass TAB1 nach Deletion der Serine 452-457 direkt oder indirekt die CCL5 3'UTR deutlich stärker stabilisiert als TAB1wt. Im Gegensatz hierzu aktivierte TAB1wt bei Koexpression von p38 den stabilisierenden Effekt von p38 auf die CCL5 3'UTR deutlich stärker, als p38 und TAB1 ohne die Serine 452-457. Demnach stabilisiert TAB1 nach Deletion der Serine 452-457 alleine die Luziferase CCL5 3'UTR auf einem anderen bisher unbekannten p38 unabhängigen Weg (Abbildung 5.5).

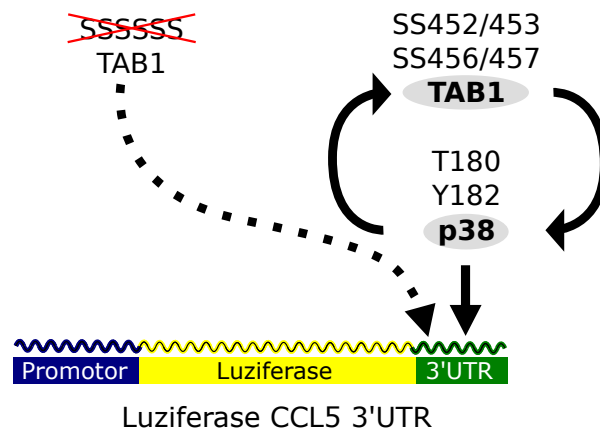


Abbildung 5.5: TAB1 aktiviert den stabilisierenden Effekt von p38 auf die CCL5 3'UTR.

Dieser Effekt ist abhängig von den Phosphorylierungsstellen T180 und Y182 von p38, sowie von den Phosphorylierungsstellen SS452/453 und SS456/457 von TAB1. In Abhängigkeit von den Serinen 452-457 induziert TAB1 die p38 eingeleitete Luziferase mRNA Stabilisierung durch Einfluss auf die CCL5 3'UTR. Das T180 von p38 ist essentiell für die TAB1 induzierte Luziferase mRNA Stabilisierung durch Einfluss auf die CCL5 3'UTR. Nach der Mutation von Y182 in p38 entsteht eine intermediär aktive Form, die durch TAB1 noch aktivierbar ist. TAB1 alleine stabilisiert, nach Deletion der Serine 452-457, die Luziferase CCL5 3'UTR auf einem bisher unbekannten p38 unabhängigen Weg (gestrichelter Pfeil).

Der destabilisierende Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA kann durch IL-1 nicht aufgehoben werden.

IL-1 reicht als Stimulus nicht aus, um eine Stabilisierung der Luziferase CCL5 3'UTR messen zu können. Mögliche Gründe sind, dass die p38 und TAB1 bedingten Effekte von IL-1 unabhängig sind. Ein anderer Grund könnte sein, dass die Überexpression von p38 und TAB1 einen deutlich stärkeren Stimulus darstellt. Des Weiteren könnte der durch den Vorgang der Transfektion von Reporterplasmiden verursachte Stress den Effekt durch IL-1 überlagern, so dass Effekte nur bei Überstimulation zu messen sind. Ein weiterer Grund wäre, dass das künstliche Luziferase CCL5 3'UTR Konstrukt aufgrund der fehlenden CCL5 5'UTR und der fehlenden CCL5 mRNA weniger empfindlich auf stabilisierende Einflüsse reagiert als die endogene CCL5 mRNA. Zusätzlich unterscheidet sich die Menge an künstlich eingebrachter Luziferase CCL5 3'UTR möglicherweise stark von der endogenen CCL5 mRNA Menge, so dass ein anderes Gleichgewicht innerhalb der Zelle vorherrscht.

Der destabilisierende Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA ist auch nach Blockieren der mRNA Synthese nicht durch IL-1 beeinflussbar.

Die oben genannten Einflüsse, im Besonderen die wahrscheinlich deutlich erhöhte künstlich eingebrachte Luziferase CCL5 3'UTR, können auch nach Hemmung der mRNA Neusynthese durch Actinomycin D, nicht ausgeglichen werden.

Hao et al. beschrieben (siehe Einleitung 1.7.2) für Gruppe III Gene, zu denen diese Arbeitsgruppe auch die CCL5 mRNA zählt, eine Halbwertszeit von mehr als 8 Stunden bei einer verwendeten Konzentration von 10µg/ml Actinomycin D [87]. In dieser Arbeit zeigte sich unter Verwendung einer Konzentration von 10µg/ml Actinomycin D in A549 Zellen im Mittel eine Halbwertszeit der Luziferase-CCL5 3'UTR mRNA von 13,66 Stunden (Abbildung 4.14 und nicht gezeigter Versuch), welche ebenfalls am ehesten der Gruppe III zuzuordnen wäre.

TAB1ΔS vermindert den Actinomycin D induzierten Abfall der Luziferase-CCL5 3'UTR mRNA.

Überexpression von TAB1wt und TAB1ΔS und Behandlung mit Actinomycin D bestätigten, dass TAB1ΔS die Luziferase CCL5 3'UTR auf mRNA Ebene stabilisiert (Abbildung 4.14). Die Ergebnisse beider Versuche ohne und mit Actinomycin D unterscheiden sich im Ergebnis der Reportergenversuche. In dem Experiment mit Actinomycin D wird auch der Luziferase-Empty-Vektor (Kontrollvektor), von der CCL5 3'UTR unabhängig, durch TAB1ΔS stabilisiert.

Ein möglicher Grund, dass in dem Versuch mit Actinomycin D (Abbildung 4.14) auf Ebene der Luziferase mRNA, aber nicht auf Ebene der Luziferaseaktivität ein Unterschied messbar war, ist die höhere Empfindlichkeit der Real-Time PCR, mit der geringe Unterschiede genauer detektiert werden können. Eine weitere mögliche Ursache ist, analog zu dem oben beschriebenen Transfektionsstress, Stress für die Zellen, der durch die Actinomycin D Behandlung ausgelöst wird und der die Translation der Luziferase mRNA beeinflusst.

Aus den Luziferaseassays resultieren höhere Signifikanzniveaus im Vergleich zu Real-Time PCR Versuchen.

Über alle Versuche übergreifend zeigte sich für den Luziferaseassay ein kleinerer Fehler, als für die Messungen durch die Real-Time-PCR. Somit zeigten die Luzifera-

seexperimente die höheren Signifikanzniveaus und erlauben damit validere Aussagen, wobei die Tendenz zwischen den Ergebnissen des Luziferaseassays und der Real-Time-PCR weitestgehend identisch waren.

Zusammenfassung und Ausblick.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TAB1 und p38 auf posttranskriptioneller Ebene das CCL5 Gen beeinflussen.

Dies macht deutlich, dass die Identifikation von Signalwegen für ein besseres Verständnis der Signalwege bei Entzündungsprozessen wichtig ist. Des Weiteren ist die genaue detaillierte Charakterisierung von Signalwegen der Entzündungskaskade die unverzichtbare Voraussetzung für die Entwicklung zukünftiger, spezifischer Therapieansätze.

6 Zusammenfassung

Entzündung dient der Erhaltung und Wiederherstellung der körperlichen Integrität und ist eine wichtige Reaktion des Immunsystems. Entzündung eliminiert Noxen und führt zu einer Genesung des geschädigten Gewebes. Die Entzündungszeichen calor, rubor, tumor, dolor und functio laesa werden durch Zytokine wie IL-1, TNF oder IL-6 ausgelöst, welche ihre Wirkung über Effektorchemokine wie CCL5 vermitteln. Hierbei wird die Bildung und Freisetzung der Zytokine und Chemokine fein reguliert und kontrolliert, um eine angemessene Entzündungsantwort zu erreichen.

Die Expression von CCL5 wird vor allem durch den MAPK-Signalweg reguliert. Dieser kann durch das endogene Zytokin IL-1 aktiviert werden. Innerhalb des von IL-1 ausgelösten Signalweges kommt es ausgehend von der MAPKKK TAK1 bis zur MAPK p38 zu einer Kaskade von Proteinphosphorylierungen. Die MAPK p38 reguliert viele weitere Proteine, die die Transkription, mRNA Stabilität oder die Translation beeinflussen.

Eine weitere bekannte Möglichkeit der Aktivierung von p38, unabhängig von der Aktivierung durch den MAPK-Signalweg, ist die durch das Protein TAB1 induzierte Autophosphorylierung der p38 MAPK. Die Funktion der TAB1 induzierten Autophosphorylierung der p38 MAPK in der IL-1 Signalkaskade ist bisher unbekannt. Eine wichtige Funktion sowohl für die Autophosphorylierung von p38, als auch für die subzelluläre Lokalisation von p38 und TAB1 haben die neu identifizierten Phosphorylierungsstellen der Aminosäuren S452-457 von TAB1 [53]. Die Deletion der Serine 452-457 von TAB1 führt zu einer zytosolischen Lokalisation von TAB1 [53]. TAB1 ist, in Abhängigkeit von dem Serincluster 452-457, essentiell für die IL-1 induzierte CCL5 Sekretion [53].

Bisher war unbekannt, ob der CCL5 Promotor einer Regulation durch p38 oder TAB1 unterliegt. In eigenen Versuchen mit einem CCL5-Promotor-Luziferase Konstrukt zeigten p38 oder TAB1 keinen transkriptionellen Effekt auf den CCL5-Promotor. Ebenfalls war bisher unbekannt, ob die CCL5 mRNA in ihrer 3'UTR regulatorische Elemente enthält, welche durch p38 und/oder TAB1 reguliert werden. Durch Verwen-

dung eines CCL5-3'UTR-Luziferasekonstruktes zeigt diese Arbeit, dass die CCL5 3'UTR nach Deletion der Aminosäuren 452-457 in TAB1 stabilisiert wird. Des Weiteren führt die TAB1 induzierte Autophosphorylierung von p38 an den Aminosäuren T180 und Y182 zu einer Stabilisierung der CCL5 3'UTR. Diese Stabilisierung der CCL5 3'UTR ist vollständig abhängig von der essentiellen Phosphorylierungsstelle p38T180 und anteilig abhängig von p38Y182. Die TAB1 induzierte Autophosphorylierung von p38 an den Aminosäuren T180 und Y182, die zu einer Stabilisierung der CCL5 3'UTR führt, ist wiederum abhängig von TAB1 und seinen Phosphorylierungsstellen 452-457.

Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass die gegenseitige Beeinflussung und Phosphorylierung der p38 MAPK und TAB1 zu einer Stabilisierung von mRNA, wie der von CCL5 führt. Damit ist die von dem Serincluster von TAB1 abhängige TAB1 induzierte Autophosphorylierung der p38 MAPK wichtig für die posttranskriptionelle Regulation inflammationsassoziiierter Gene.

7 Summary

Inflammation conserves and recovers the physical integrity and is an important reaction of the immune system. Inflammation eliminates noxious effects and convalesces injured tissue. The inflammatory hallmarks calor, rubor, tumor, dolor and functio laesa are triggered by cytokines like IL-1, TNF or IL-6, which mediate amongst others their effect by chemokines like CCL5. The production and release of cytokines and chemokines is tightly regulated and controlled to generate a well-balanced inflammatory response.

The expression of CCL5 especially is primarily regulated by the MAPK signaling pathway which can be activated by the endogenous cytokine IL-1. Within the MAPK pathway, there is a cascade of protein phosphorylations delivered from the MAPKKK TAK1 downstream to the MAPK p38. The MAPK p38 regulates a lot of proteins which influence transcription, mRNA stability or protein translation.

It is known, that p38 MAPK can also be activated independent of the MAPK cascade by a TAB1-induced autophosphorylation of p38 MAPK. So far, the functional relevance of the TAB1-induced p38 autophosphorylation in the IL-1 signaling pathway is unknown. The newly identified phosphorylation sites of TAB1, namely amino acids S452-457, play an important role in autophosphorylation of p38 MAPK and subcellular localization of p38 MAPK and TAB1 [53]. Deletion of serines 452-457 of TAB1 causes cytosolic localization of TAB1 [53]. Moreover, TAB1, dependent on the serine cluster 452-457, is essential for the IL-1 induced CCL5 secretion [53].

Until now, it was unknown whether the CCL5 promoter is regulated by p38 MAPK or TAB1. In own experiments using a CCL5 promoter luciferase construct, we revealed that p38 MAPK or TAB1 had no transcriptional effect on the CCL5 promoter. It was also unknown whether there are regulatory elements in the 3'UTR of the CCL5 mRNA, which are regulated by p38 MAPK and/or TAB1. Using a CCL5-3'UTR-luciferase construct, we showed that after deletion of the amino acids 452-457 of TAB1, the CCL5 3'UTR is stabilized. Furthermore, TAB1 induced autophosphorylation of p38 MAPK at amino acids T180 and Y182 stabilizes the CCL5 3'UTR. This CCL5 3'UTR stabilisation

on is completely dependent on the essential phosphorylation site T180 of p38 MAPK and partially dependent from Y182 of p38 MAPK. It was also exhibited that TAB1-induced p38 autophosphorylation at amino acids T180 and Y182, which stabilises CCL5 3'UTR, is dependent on the phosphorylation sites 452-457 in TAB1.

These results strongly point to a mutual influence on phosphorylation between p38 MAPK and TAB1, which stabilizes mRNAs like the CCL5 mRNA. Therefore, we conclude that TAB1-induced autophosphorylation of p38 MAPK, dependent on the serine cluster of TAB1, is important for post-transcriptional regulation of inflammatory associated genes.

8 Abkürzungsverzeichnis

β-Gal	β-Galaktosidase
Abb.	Abbildung
Act. D	Actinomycin D
AMD	ARE-mediated decay
AMP	adenosine monophosphate (Adenosinmonophosphat)
AMPK	adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase
AP-1	activator protein-1
ARE-BP	ARE-binding protein
AREs	AU-rich elements
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATP	Adenosintriphosphat
BFP	blue fluorescent protein (blau fluoreszierendes Protein)
BRF1	Butyrate response factor 1
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderalbumin)
CAREs	CA-reiche Elemente
CCL5	CC-Chemokin Ligand 5
CCR	C-C Chemokinrezeptor
CDE	constitutive decay element
COX	Cyclooxygenase
CRE	cyclic AMP-response element
CREB	cAMP response element binding protein
CURE	CU-reiche Element
DAMPs	Danger-associated molecular patterns (Gefahr-assoziierte molekulare Muster)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DLK	dual leucine zipper kinase
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF-4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay = enzymgekoppelter Immunsorptionsstest
ERK	extracellular signal-regulated kinase (extrazellulär signalregulierte Kinase)
FAM	6-FAM-phosphoramidit
FCS	fetales Kälberserum
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
g	Erdbeschleunigung: $9,81\text{m/s}^2$
GFP	green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
GRE	GU-reiche Elemente
h	hours (Stunden)
HeBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoparticle
HSP	Heat Shock Protein (Hitzeschockprotein)
I κ B	inhibitor of κ B (inhibitorische κ B-Proteine)
IFN- γ	Interferon- γ
IKK	I κ B α -Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IREs	iron responsive elements
ISRE	interferon-stimulated responsive element
JNK	C-jun N-terminal kinase (c-Jun N-terminale Kinase)
KSRP	K-homology-type splicing regulatory protein
luc.	luciferase (Luziferase)
M-MuLV RT	Moloney Murine leukemia virus reverse transcriptase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKKK	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase

Mef	mouse embryonic fibroblast (embryonale Mausfibroblasten)
MEKK 1	Mitogen-activated protein/ERK kinase kinase 1
miRNA	micro RNA
MK2	MAPKAP (MAPK-activated protein) kinase 2
MKK	MAPKK
MKP	MAPK-Phosphatase
MLK3	mixed-lineage kinase 3
MNK2B	MAP kinase-interacting kinase 2B
mRNA	messenger RNA
MSK1	Mitogen- and stress-activated protein kinase 1
ncRNA	non-coding RNA
NF	nuclear factor (Kernfaktor)
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (Kernfaktor- κ B)
nt	Nukleotide
P-Bodies	processing bodies
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBS	phosphate buffer saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Protein Phosphatase
PRAK	p38-regulated/activated kinase
PSLG	100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 2mM L-Glutamin
RANTES	regulated upon activation, normal T expressed, and presumably secreted
RBP	RNA-binding proteins
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	respiratory syncytial virus
RT	Reverse Transkriptase
S.E.M.	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SECIS	selenocysteine insertion sequence element
SG	SwitchGear Genomics
SIS	small inducible secreted proteins
SLDE	stem-loop destabilizing element

SNP	Single Nucleotide Polymorphism = Einzelnukleotid-Polymorphismus
SV-40	Simian-Virus 40
TAB1	Transforming growth factor- β -activated protein 1 (TAK1)-binding protein 1
TAK1	TGF- β -activated kinase 1
TCR	T cell antigen receptor
TGF- β	transforming growth factor- β
TLR	Toll-like receptor (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
Tris	Tri(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	tristetraproline
UTR	Untranslated Region (untranslatierter Bereich)
v/v	Volumen/Volumen
VEGF	vascular endothelial growth factor
wt	Wildtyp

9 Abbildungsverzeichnis

1.1	Mitogenaktivierte Proteinkinase Kaskade	3
1.2	Aufbau von humanem TAB1	7
1.3	Biologische Funktion von CCL5 (RANTES)	8
1.4	„C-C“ Zweig der Platelet Faktor 4 Superfamilie	9
1.5	Schema des CCL5 Promotor-Deletionskonstruktes	12
1.6	TNF-aktivierte Gene können in drei verschiedene Kinetikgruppen eingeteilt werden	13
4.1	Vergleichbar hohe CCL5-Konzentrationen bei der β -Galaktosidase-Lyse und bei Sonifizieren im Vergleich zur Lyse nach R&D	44
4.2	HeLa tTA zeigen nach IL-1 Stimulation einen leichten Anstieg der CCL5 mRNA Expression, Translation und Sekretion	46
4.3	A549 Zellen zeigen eine starke IL-1 abhängige CCL5 Sekretion, aber keine TNF abhängige CCL5 Sekretion	47
4.4	A549 Zellen zeigen nach IL-1 Stimulation eine starke CCL5 Genexpression	48
4.5	CCL5 aus A549 Überstand nach Wegfrieren und Auftauen näherungsweise unverändert	49
4.6	Stärkster Anstieg der CCL5 Sekretion bei A549 Zellen zwischen 2 und 4 Stunden nach IL-1 Stimulation	50
4.7	Die Rekonstitution von Mef TAB1 Knockout Zellen mit TAB1 oder TAB1 Δ S hat keinen Einfluss auf den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR	54
4.8	Die Deletion der Aminosäuren 452-457 von TAB1 hebt den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA in A549 Zellen auf	57
4.9	TAB1 induziert die p38 eingeleitete mRNA Stabilisierung von CCL5 in Abhängigkeit von den Serinen 452-457	61

4.10	T180 von p38 ist essentiell für die TAB1 induzierte Stabilisierung der CCL5 3'UTR	65
4.11	Die Mutation von Y182 führt zu einer intermediär aktiven Form von p38, die durch TAB1 noch aktivierbar ist	68
4.12	Der destabilisierende Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA kann durch IL-1 nicht aufgehoben werden	72
4.13	Der destabilisierende Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA ist nicht durch IL-1 beeinflussbar	75
4.14	TAB1 Δ S vermindert den Actinomycin D induzierten Abfall der Luziferase-CCL5 3'UTR mRNA	78
5.1	Wechselseitige Phosphorylierung und Aktivierung von p38 und TAB1 . .	82
5.2	CCL5 Promotor Reportergenkonstrukt	84
5.3	CCL5 3'UTR Reportergenkonstrukt	85
5.4	Die Deletion der Aminosäuren 452-457 von TAB1 hebt den destabilisierenden Effekt der CCL5 3'UTR auf die Luziferase mRNA in A549 Zellen auf	87
5.5	TAB1 aktiviert den stabilisierenden Effekt von p38 auf die CCL5 3'UTR .	90

10 Literaturverzeichnis

- [1] Giovanni Lucignani. Rubor, calor, tumor, dolor, functio laesa... or molecular imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 34(12):2135–2141, Dec 2007.
- [2] Michael Kracht and Jeremy Saklatvala. Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine*, 20(3):91–106, Nov 2002.
- [3] Matthias Gaestel, Alexey Kotlyarov, and Michael Kracht. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat Rev Drug Discov*, 8(6):480–499, Jun 2009.
- [4] Luke A J O'Neill and Andrew G Bowie. The family of five: Tir-domain-containing adaptors in toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 7(5):353–364, May 2007.
- [5] Tatsukata Kawagoe, Shintaro Sato, Kazufumi Matsushita, Hiroki Kato, Kosuke Matsui, Yutaro Kumagai, Tatsuya Saitoh, Taro Kawai, Osamu Takeuchi, and Shizuo Akira. Sequential control of toll-like receptor-dependent responses by irak1 and irak2. *Nat Immunol*, 9(6):684–691, Jun 2008.
- [6] Jae-Hyuck Shim, Changchun Xiao, Amber E Paschal, Shannon T Bailey, Ping Rao, Matthew S Hayden, Ki-Young Lee, Crystal Bussey, Michael Steckel, Nobuyuki Tanaka, Gen Yamada, Shizuo Akira, Kunihiro Matsumoto, and Sankar Ghosh. Tak1, but not tab1 or tab2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev*, 19(22):2668–2681, Nov 2005.
- [7] Chen Dong, Roger J Davis, and Richard A Flavell. Map kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*, 20:55–72, 2002.
- [8] J. M. Kyriakis and J. Avruch. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 81(2):807–869, Apr 2001.

- [9] Melissa R Junttila, Song-Ping Li, and Jukka Westermarck. Phosphatase-mediated crosstalk between mapk signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*, 22(4):954–965, Apr 2008.
- [10] C. Widmann, S. Gibson, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 79(1):143–180, Jan 1999.
- [11] Peter C F Cheung, David G Campbell, Angel R Nebreda, and Philip Cohen. Feedback control of the protein kinase tak1 by sapk2a/p38alpha. *EMBO J*, 22(21):5793–5805, Nov 2003.
- [12] K. Yamaguchi, K. Shirakabe, H. Shibuya, K. Irie, I. Oishi, N. Ueno, T. Taniuchi, E. Nishida, and K. Matsumoto. Identification of a member of the mapkkk family as a potential mediator of tgfbeta signal transduction. *Science*, 270(5244):2008–2011, Dec 1995.
- [13] H. Ichijo, E. Nishida, K. Irie, P. ten Dijke, M. Saitoh, T. Moriguchi, M. Takagi, K. Matsumoto, K. Miyazono, and Y. Gotoh. Induction of apoptosis by ask1, a mammalian mapkkk that activates sapk/jnk and p38 signaling pathways. *Science*, 275(5296):90–94, Jan 1997.
- [14] Kathleen A Gallo and Gary L Johnson. Mixed-lineage kinase control of jnk and p38 mapk pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(9):663–672, Sep 2002.
- [15] G. Fan, S. E. Merritt, M. Kortenjann, P. E. Shaw, and L. B. Holzman. Dual leucine zipper-bearing kinase (dlk) activates p46sapk and p38mapk but not erk2. *J Biol Chem*, 271(40):24788–24793, Oct 1996.
- [16] Takuji Tanoue and Eisuke Nishida. Molecular recognitions in the map kinase cascades. *Cell Signal*, 15(5):455–462, May 2003.
- [17] Mutsuhiro Takekawa, Kazuo Tatebayashi, and Haruo Saito. Conserved docking site is essential for activation of mammalian map kinase kinases by specific map kinase kinase kinases. *Mol Cell*, 18(3):295–306, Apr 2005.
- [18] J. C. Lee, J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Heys, and S. W. Landvatter. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 372(6508):739–746, 1994.

- [19] J. Han, J. D. Lee, L. Bibbs, and R. J. Ulevitch. A map kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 265(5173):808–811, Aug 1994.
- [20] J. Rouse, P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt, and A. R. Nebreda. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates mapkap kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, 78(6):1027–1037, Sep 1994.
- [21] N. W. Freshney, L. Rawlinson, F. Guesdon, E. Jones, S. Cowley, J. Hsuan, and J. Saklatvala. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of hsp27. *Cell*, 78(6):1039–1049, Sep 1994.
- [22] Y. Jiang, C. Chen, Z. Li, W. Guo, J. A. Gegner, S. Lin, and J. Han. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem*, 271(30):17920–17926, Jul 1996.
- [23] C. Lechner, M. A. Zahalka, J. F. Giot, N. P. Møller, and A. Ullrich. Erk6, a mitogen-activated protein kinase involved in c2c12 myoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(9):4355–4359, Apr 1996.
- [24] M. Goedert, A. Cuenda, M. Craxton, R. Jakes, and P. Cohen. Activation of the novel stress-activated protein kinase sapk4 by cytokines and cellular stresses is mediated by skk3 (mkk6); comparison of its substrate specificity with that of other sap kinases. *EMBO J*, 16(12):3563–3571, Jun 1997.
- [25] Y. Jiang, H. Gram, M. Zhao, L. New, J. Gu, L. Feng, F. Di Padova, R. J. Ulevitch, and J. Han. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem*, 272(48):30122–30128, Nov 1997.
- [26] Baoxue Ge, Hermann Gram, Franco Di Padova, Betty Huang, Liguao New, Richard J Ulevitch, Ying Luo, and Jiahuai Han. Mapkk-independent activation of p38alpha mediated by tab1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science*, 295(5558):1291–1294, Feb 2002.
- [27] Gang Lu, Young Jun Kang, Jiahuai Han, Harvey R Herschman, Enrico Stefani, and Yibin Wang. Tab-1 modulates intracellular localization of p38 map kinase and downstream signaling. *J Biol Chem*, 281(9):6087–6095, Mar 2006.

- [28] Peter C F Cheung, Angel R Nebreda, and Philip Cohen. Tab3, a new binding partner of the protein kinase tak1. *Biochem J*, 378(Pt 1):27–34, Feb 2004.
- [29] Jesus M Salvador, Paul R Mittelstadt, Tad Guszczynski, Terry D Copeland, Hiroshi Yamaguchi, Ettore Appella, Albert J Fornace, and Jonathan D Ashwell. Alternative p38 activation pathway mediated by t cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat Immunol*, 6(4):390–395, Apr 2005.
- [30] M. Takekawa, M. Adachi, A. Nakahata, I. Nakayama, F. Itoh, H. Tsukuda, Y. Taya, and K. Imai. p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 mapk-p53 signaling in response to uv radiation. *EMBO J*, 19(23):6517–6526, Dec 2000.
- [31] M. Takekawa, T. Maeda, and H. Saito. Protein phosphatase 2calpha inhibits the human stress-responsive p38 and jnk mapk pathways. *EMBO J*, 17(16):4744–4752, Aug 1998.
- [32] J. Raingeaud, S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch, and R. J. Davis. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*, 270(13):7420–7426, Mar 1995.
- [33] R. Ben-Levy, S. Hooper, R. Wilson, H. F. Paterson, and C. J. Marshall. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate mapkap kinase-2. *Curr Biol*, 8(19):1049–1057, Sep 1998.
- [34] Philippe P Roux and John Blenis. Erk and p38 mapk-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(2):320–344, Jun 2004.
- [35] Ligu New, Yong Jiang, and Jiahuai Han. Regulation of prak subcellular location by p38 map kinases. *Mol Biol Cell*, 14(6):2603–2616, Jun 2003.
- [36] S. Rousseau, F. Houle, J. Landry, and J. Huot. p38 map kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*, 15(18):2169–2177, Oct 1997.
- [37] R. M. Heuertz, S. M. Tricomi, U. R. Ezekiel, and R. O. Webster. C-reactive protein inhibits chemotactic peptide-induced p38 mitogen-activated protein kinase

activity and human neutrophil movement. *J Biol Chem*, 274(25):17968–17974, Jun 1999.

- [38] L. Shapiro and C. A. Dinarello. Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(26):12230–12234, Dec 1995.
- [39] R. Beyaert, A. Cuenda, W. Vanden Berghe, S. Plaisance, J. C. Lee, G. Haegeman, P. Cohen, and W. Fiers. The p38/rk mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J*, 15(8):1914–1923, Apr 1996.
- [40] D. Hwang, B. C. Jang, G. Yu, and M. Boudreau. Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and nf-kappab signaling pathways in macrophages. *Biochem Pharmacol*, 54(1):87–96, Jul 1997.
- [41] Lisa S Berenson, Jianfei Yang, Barry P Sleckman, Theresa L Murphy, and Kenneth M Murphy. Selective requirement of p38alpha mapk in cytokine-dependent, but not antigen receptor-dependent, th1 responses. *J Immunol*, 176(8):4616–4621, Apr 2006.
- [42] Khalid S A Khabar. The au-rich transcriptome: more than interferons and cytokines, and its role in disease. *J Interferon Cytokine Res*, 25(1):1–10, Jan 2005.
- [43] G. Takaesu, S. Kishida, A. Hiyama, K. Yamaguchi, H. Shibuya, K. Irie, J. Ninomiya-Tsuji, and K. Matsumoto. Tab2, a novel adaptor protein, mediates activation of tak1 mapkkk by linking tak1 to traf6 in the il-1 signal transduction pathway. *Mol Cell*, 5(4):649–658, Apr 2000.
- [44] K. Kishimoto, K. Matsumoto, and J. Ninomiya-Tsuji. Tak1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *J Biol Chem*, 275(10):7359–7364, Mar 2000.
- [45] Yang Yu, Ningling Ge, Min Xie, Wenjing Sun, Susan Burlingame, Amy K Pass, Jed G Nuchtern, Dekai Zhang, Songbin Fu, Michael D Schneider, Jia Fan, and Jianhua Yang. Phosphorylation of thr-178 and thr-184 in the tak1 t-loop is required for interleukin (il)-1-mediated optimal nfkappab and ap-1 activation as well as il-6 gene expression. *J Biol Chem*, 283(36):24497–24505, Sep 2008.

- [46] Yihui Fan, Yang Yu, Yi Shi, Wenjing Sun, Min Xie, Ningling Ge, Renfang Mao, Alex Chang, Gufeng Xu, Michael D Schneider, Hong Zhang, Songbin Fu, Jun Qin, and Jianhua Yang. Lysine 63-linked polyubiquitination of tak1 at lysine 158 is required for tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-induced ikk/nf-kappab and jnk/ap-1 activation. *J Biol Chem*, 285(8):5347–5360, Feb 2010.
- [47] Alessandro Sorrentino, Noopur Thakur, Susanne Grimsby, Anders Marcusson, Verena von Bulow, Norbert Schuster, Shouting Zhang, Carl-Henrik Heldin, and Maréne Landström. The type i tgf-beta receptor engages traf6 to activate tak1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat Cell Biol*, 10(10):1199–1207, Oct 2008.
- [48] H. Shibuya, K. Yamaguchi, K. Shirakabe, A. Tonegawa, Y. Gotoh, N. Ueno, K. Irie, E. Nishida, and K. Matsumoto. Tab1: an activator of the tak1 mapkkk in tgf-beta signal transduction. *Science*, 272(5265):1179–1182, May 1996.
- [49] Tohru Ishitani, Giichi Takaesu, Jun Ninomiya-Tsuji, Hiroshi Shibuya, Richard B Gaynor, and Kunihiro Matsumoto. Role of the tab2-related protein tab3 in il-1 and tnf signaling. *EMBO J*, 22(23):6277–6288, Dec 2003.
- [50] Malene Bertelsen and Annika Sanfridson. Tab1 modulates il-1alpha mediated cytokine secretion but is dispensable for tak1 activation. *Cell Signal*, 19(3):646–657, Mar 2007.
- [51] Maiko Inagaki, Emily Omori, Jae-Young Kim, Yoshihiro Komatsu, Greg Scott, Manas K Ray, Gen Yamada, Kunihiro Matsumoto, Yuji Mishina, and Jun Ninomiya-Tsuji. Tak1-binding protein 1, tab1, mediates osmotic stress-induced tak1 activation but is dispensable for tak1-mediated cytokine signaling. *J Biol Chem*, 283(48):33080–33086, Nov 2008.
- [52] Daniela Kettner-Buhrow, Oliver Dittrich-Breiholz, Heike Schneider, Sabine Wolter, Klaus Resch, and Michael Kracht. Small interfering rnas generated by recombinant dicer induce inflammatory gene expression independent from the tak1-nfkappab-mapk signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 347(3):566–573, Sep 2006.
- [53] Alexander Wolf, Knut Beuerlein, Christoph Eckart, Hendrik Weiser, Beate Dickkopf, Helmut Müller, Hiroaki Sakurai, and Michael Kracht. Identification and

functional characterization of novel phosphorylation sites in tak1-binding protein (tab) 1. *PLoS One*, 6(12):e29256, 2011.

- [54] Emily Omori, Maiko Inagaki, Yuji Mishina, Kunihiro Matsumoto, and Jun Ninomiya-Tsuji. Epithelial transforming growth factor β -activated kinase 1 (tak1) is activated through two independent mechanisms and regulates reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(9):3365–3370, Feb 2012.
- [55] H. Sakurai, H. Miyoshi, J. Mizukami, and T. Sugita. Phosphorylation-dependent activation of tak1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by tab1. *FEBS Lett*, 474(2-3):141–145, Jun 2000.
- [56] Heidi Mendoza, David G Campbell, Kerry Burness, James Hastie, Natalia Ronkina, Jae-Hyuck Shim, J. Simon C Arthur, Roger J Davis, Matthias Gaestel, Gary L Johnson, Sankar Ghosh, and Philip Cohen. Roles for tab1 in regulating the il-1-dependent phosphorylation of the tab3 regulatory subunit and activity of the tak1 complex. *Biochem J*, 409(3):711–722, Feb 2008.
- [57] T. J. Schall, J. Jongstra, B. J. Dyer, J. Jorgensen, C. Clayberger, M. M. Davis, and A. M. Krensky1. A human t cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol*, 141(3):1018–1025, Aug 1988.
- [58] Mark A Batzer and Prescott L Deininger. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet*, 3(5):370–379, May 2002.
- [59] Alan M Krensky and Yong-Tae Ahn. Mechanisms of disease: regulation of rantes (ccl5) in renal disease. *Nat Clin Pract Nephrol*, 3(3):164–170, Mar 2007.
- [60] K. D. Brown, S. M. Zurawski, T. R. Mosmann, and G. Zurawski. A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes. *J Immunol*, 142(2):679–687, Jan 1989.
- [61] T. J. Schall. Biology of the rantes/sis cytokine family. *Cytokine*, 3(3):165–183, May 1991.
- [62] L. M. Teran. Ccl chemokines and asthma. *Immunol Today*, 21(5):235–242, May 2000.

- [63] V. Appay and S. L. Rowland-Jones. Rantes: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol*, 22(2):83–87, Feb 2001.
- [64] Zdenka Navratilova. Polymorphisms in ccl2&ccl5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 150(2):191–204, Nov 2006.
- [65] R. Meliconi, L. Pulsatelli, M. Uguccioni, C. Salvarani, P. Macchioni, C. Melchiorri, M. C. Focherini, L. Frizziero, and A. Facchini. Leukocyte infiltration in synovial tissue from the shoulder of patients with polymyalgia rheumatica. quantitative analysis and influence of corticosteroid treatment. *Arthritis Rheum*, 39(7):1199–1207, Jul 1996.
- [66] D. A. Barnes, M. Huston, R. Holmes, E. N. Benveniste, V. W. Yong, P. Scholz, and H. D. Perez. Induction of rantes expression by astrocytes and astrocytoma cell lines. *J Neuroimmunol*, 71(1-2):207–214, Dec 1996.
- [67] Q. Q. Li and C. T. Bever. Th1 cytokines stimulate rantes chemokine secretion by human astroglial cells depending on de novo transcription. *Neurochem Res*, 26(2):125–133, Feb 2001.
- [68] Mee-Ohk Kim, Hyeon-Sook Suh, Celia F Brosnan, and Sunhee C Lee. Regulation of rantes/ccl5 expression in human astrocytes by interleukin-1 and interferon-beta. *J Neurochem*, 90(2):297–308, Jul 2004.
- [69] H. Liu, T. Shioda, Y. Nagai, A. Iwamoto, C. Wasi, J. Ma, W. Liang, Y. Takebe, I. Theodorou, M. Magierowska, R. Krishnamoorthy, A. Chaventr , and P. Debre. Distribution of hiv-1 disease modifying regulated on activation normal t cell expressed and secreted haplotypes in asian, african and caucasian individuals. french alt and immunoco study group. *AIDS*, 13(18):2602–2603, Dec 1999.
- [70] Donald Gullberg. Re-programmable tumour cells: cytokines from the immune system assume new roles with the help of stem cells. *Scand J Immunol*, 67(6):632–633, Jun 2008.
- [71] A. O. Kraaijeveld, S. C A de Jager, W. J. de Jager, B. J. Prakken, S. R. McColl, I. Haspels, H. Putter, T. J C van Berkel, L. Nagelkerken, J. W. Jukema, and E. A L Biessen. Cc chemokine ligand-5 (ccl5/rantes) and cc chemokine

ligand-18 (ccl18/parc) are specific markers of refractory unstable angina pectoris and are transiently raised during severe ischemic symptoms. *Circulation*, 116(17):1931–1941, Oct 2007.

- [72] Vincent Braunersreuther, Corinne Pellieux, Graziano Pelli, Fabienne Burger, Sabine Steffens, Christophe Montessuit, Christian Weber, Amanda Proudfoot, François Mach, and Claire Arnaud. Chemokine ccl5/rantes inhibition reduces myocardial reperfusion injury in atherosclerotic mice. *J Mol Cell Cardiol*, 48(4):789–798, Apr 2010.
- [73] Chih-Hsin Tang, Ayaho Yamamoto, Yuh-Tzy Lin, Yi-Chin Fong, and Tzu-Wei Tan. Involvement of matrix metalloproteinase-3 in ccl5/ccr5 pathway of chondrosarcomas metastasis. *Biochem Pharmacol*, 79(2):209–217, Jan 2010.
- [74] Marie-Luise Berres, Rory R Koenen, Anna Rueland, Mirko Moreno Zaldivar, Daniel Heinrichs, Hacer Sahin, Petra Schmitz, Konrad L Streetz, Thomas Berg, Nikolaus Gassler, Ralf Weiskirchen, Amanda Proudfoot, Christian Weber, Christian Trautwein, and Hermann E Wasmuth. Antagonism of the chemokine ccl5 ameliorates experimental liver fibrosis in mice. *J Clin Invest*, 120(11):4129–4140, Nov 2010.
- [75] Georgi Kirovski, Erwin Gäbele, Christoph Dorn, Lukas Moleda, Christoph Niesen, Thomas S Weiss, Hella Wobser, Doris Schacherer, Christa Buechler, Hermann E Wasmuth, and Claus Hellerbrand. Hepatic steatosis causes induction of the chemokine rantes in the absence of significant hepatic inflammation. *Int J Clin Exp Pathol*, 3(7):675–680, 2010.
- [76] Chang Keun Kim, Jungi Choi, Zak Callaway, Koji Iijima, Gerald Volcheck, and Hirohito Kita. Increases in airway eosinophilia and a th1 cytokine during the chronic asymptomatic phase of asthma. *Respir Med*, 104(10):1436–1443, Oct 2010.
- [77] Christina A Bursill, Maria L Castro, Douglas T Beattie, Shirley Nakhla, Emiel van der Vorst, Alison K Heather, Philip J Barter, and Kerry-Anne Rye. High-density lipoproteins suppress chemokines and chemokine receptors in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(9):1773–1778, Sep 2010.

- [78] Bridget Vesosky, Erin K Rottinghaus, Paul Stromberg, Joanne Turner, and Gillian Beamer. Ccl5 participates in early protection against mycobacterium tuberculosis. *J Leukoc Biol*, 87(6):1153–1165, Jun 2010.
- [79] Miriam Canavese, Fiorella Altruda, and Lorenzo Silengo. Therapeutic efficacy and immunological response of ccl5 antagonists in models of contact skin reaction. *PLoS One*, 5(1):e8725, 2010.
- [80] Gali Soria and Adit Ben-Baruch. The inflammatory chemokines ccl2 and ccl5 in breast cancer. *Cancer Lett*, 267(2):271–285, Aug 2008.
- [81] Andreas Schober. Chemokines in vascular dysfunction and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(11):1950–1959, Nov 2008.
- [82] Paul M Hassoun, Luc Mouthon, Joan A Barberà, Saadia Eddahibi, Sonia C Flores, Friedrich Grimminger, Peter Lloyd Jones, Michael L Maitland, Evangelos D Michelakis, Nicholas W Morrell, John H Newman, Marlene Rabinovitch, Ralph Schermuly, Kurt R Stenmark, Norbert F Voelkel, Jason X-J Yuan, and Marc Humbert. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 54(1 Suppl):S10–S19, Jun 2009.
- [83] Paul Anderson. Post-transcriptional control of cytokine production. *Nat Immunol*, 9(4):353–359, Apr 2008.
- [84] Keith A Spriggs, Martin Bushell, and Anne E Willis. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell*, 40(2):228–237, Oct 2010.
- [85] A. Casola, R. P. Garofalo, H. Haeberle, T. F. Elliott, R. Lin, M. Jamaluddin, and A. R. Brasier. Multiple cis regulatory elements control rantes promoter activity in alveolar epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *J Virol*, 75(14):6428–6439, Jul 2001.
- [86] Marilyn Kozak. How strong is the case for regulation of the initiation step of translation by elements at the 3' end of eukaryotic mrnas? *Gene*, 343(1):41–54, Dec 2004.
- [87] Shengli Hao and David Baltimore. The stability of mrna influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nat Immunol*, 10(3):281–288, Mar 2009.

- [88] Eva Matoulkova, Eva Michalova, Borivoj Vojtesek, and Roman Hrstka. The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol*, 9(5), May 2012.
- [89] Thomas A Hamilton, Michael Novotny, Shyamasree Datta, Palash Mandal, Justin Hartupée, Julie Tebo, and Xiaoxia Li. Chemokine and chemoattractant receptor expression: post-transcriptional regulation. *J Leukoc Biol*, 82(2):213–219, Aug 2007.
- [90] Khalid S A Khabar. Rapid transit in the immune cells: the role of mrna turnover regulation. *J Leukoc Biol*, 81(6):1335–1344, Jun 2007.
- [91] Elke Hoffmann, Oliver Dittrich-Breiholz, Helmut Holtmann, and Michael Kracht. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol*, 72(5):847–855, Nov 2002.
- [92] D. Caput, B. Beutler, K. Hartog, R. Thayer, S. Brown-Shimer, and A. Cerami. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mrna molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(6):1670–1674, Mar 1986.
- [93] C. Y. Chen and A. B. Shyu. Au-rich elements: characterization and importance in mrna degradation. *Trends Biochem Sci*, 20(11):465–470, Nov 1995.
- [94] B. Beutler, N. Krochin, I. W. Milsark, C. Luedke, and A. Cerami. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science*, 232(4753):977–980, May 1986.
- [95] T. Wilson and R. Treisman. Removal of poly(a) and consequent degradation of c-fos mrna facilitated by 3' au-rich sequences. *Nature*, 336(6197):396–399, Nov 1988.
- [96] A. M. Zubiaga, J. G. Belasco, and M. E. Greenberg. The nonamer uuauuuauu is the key au-rich sequence motif that mediates mrna degradation. *Mol Cell Biol*, 15(4):2219–2230, Apr 1995.
- [97] Jaekyung Shim and Michael Karin. The control of mrna stability in response to extracellular stimuli. *Mol Cells*, 14(3):323–331, Dec 2002.

- [98] Carine Barreau, Luc Paillard, and H. Beverley Osborne. Au-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res*, 33(22):7138–7150, 2005.
- [99] E. Carballo, W. S. Lai, and P. J. Blackshear. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science*, 281(5379):1001–1005, Aug 1998.
- [100] Georg Stoecklin, Marco Colombi, Ines Raineri, Sabrina Leuenberger, Michel Mallaun, Martin Schmidlin, Brigitte Gross, Min Lu, Toshio Kitamura, and Christoph Moroni. Functional cloning of brf1, a regulator of are-dependent mrna turnover. *EMBO J*, 21(17):4709–4718, Sep 2002.
- [101] Chu-Fang Chou, Alok Mulky, Sushmit Maitra, Wei-Jye Lin, Roberto Gherzi, John Kappes, and Ching-Yi Chen. Tethering ksrp, a decay-promoting au-rich element-binding protein, to mrnas elicits mrna decay. *Mol Cell Biol*, 26(10):3695–3706, May 2006.
- [102] Roberto Gherzi, Kyung-Yeol Lee, Paola Briata, Daniel Wegmüller, Christoph Moroni, Michael Karin, and Ching-Yi Chen. A kh domain rna binding protein, ksrp, promotes are-directed mrna turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol Cell*, 14(5):571–583, Jun 2004.
- [103] W. S. Lai, E. Carballo, J. R. Strum, E. A. Kennington, R. S. Phillips, and P. J. Blackshear. Evidence that tristetraprolin binds to au-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mrna. *Mol Cell Biol*, 19(6):4311–4323, Jun 1999.
- [104] C. Y. Chen, R. Gherzi, S. E. Ong, E. L. Chan, R. Raijmakers, G. J. Pruijn, G. Stoecklin, C. Moroni, M. Mann, and M. Karin. Au binding proteins recruit the exosome to degrade are-containing mrnas. *Cell*, 107(4):451–464, Nov 2001.
- [105] Ujwal Sheth and Roy Parker. Decapping and decay of messenger rna occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, 300(5620):805–808, May 2003.
- [106] Wei-Jye Lin, Aaron Duffy, and Ching-Yi Chen. Localization of au-rich element-containing mrna in cytoplasmic granules containing exosome subunits. *J Biol Chem*, 282(27):19958–19968, Jul 2007.

- [107] X. F. Ming, M. Kaiser, and C. Moroni. c-jun n-terminal kinase is involved in auuua-mediated interleukin-3 mrna turnover in mast cells. *EMBO J*, 17(20):6039–6048, Oct 1998.
- [108] R. Winzen, M. Kracht, B. Ritter, A. Wilhelm, C. Y. Chen, A. B. Shyu, M. Müller, M. Gaestel, K. Resch, and H. Holtmann. The p38 map kinase pathway signals for cytokine-induced mrna stabilization via map kinase-activated protein kinase 2 and an au-rich region-targeted mechanism. *EMBO J*, 18(18):4969–4980, Sep 1999.
- [109] Georg Stoecklin, Tiffany Stubbs, Nancy Kedersha, Stephen Wax, William F C Rigby, T. Keith Blackwell, and Paul Anderson. Mk2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and are-mrna decay. *EMBO J*, 23(6):1313–1324, Mar 2004.
- [110] Georg Stoecklin, Min Lu, Bernd Rattenbacher, and Christoph Moroni. A constitutive decay element promotes tumor necrosis factor alpha mrna degradation via an au-rich element-independent pathway. *Mol Cell Biol*, 23(10):3506–3515, May 2003.
- [111] C. Y. Brown, C. A. Lagnado, and G. J. Goodall. A cytokine mrna-destabilizing element that is structurally and functionally distinct from a+u-rich elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24):13721–13725, Nov 1996.
- [112] Kihoon Yoon, Daijin Ko, Mark Doderer, Carolina B Livi, and Luiz O F Penalva. Over-represented sequences located on 3' utrs are potentially involved in regulatory functions. *RNA Biol*, 5(4):255–262, 2008.
- [113] N. Ronkina, A. Kotlyarov, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht, E. Hitti, K. Milarski, R. Askew, S. Marusic, L-L. Lin, M. Gaestel, and J-B. Telliez. The mitogen-activated protein kinase (mapk)-activated protein kinases mk2 and mk3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 mapk. *Mol Cell Biol*, 27(1):170–181, Jan 2007.
- [114] Armin Neininger, Dimitris Kontoyiannis, Alexey Kotlyarov, Reinhard Winzen, Rolf Eckert, Hans-Dieter Volk, Helmut Holtmann, George Kollias, and Matthias Gaestel. Mk2 targets au-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. *J Biol Chem*, 277(5):3065–3068, Feb 2002.

- [115] Natalia Ronkina, Manoj B Menon, Jessica Schwermann, Christopher Tiedje, Edward Hitti, Alexey Kotlyarov, and Matthias Gaestel. Mapkap kinases mk2 and mk3 in inflammation: complex regulation of tnf biosynthesis via expression and phosphorylation of tristetraprolin. *Biochem Pharmacol*, 80(12):1915–1920, Dec 2010.
- [116] Maria Buxadé, Josep L Parra, Simon Rousseau, Natalia Shpiro, Rodolfo Marquez, Nick Morrice, Jenny Bain, Enric Espel, and Christopher G Proud. The mnks are novel components in the control of tnf alpha biosynthesis and phosphorylate and regulate hnrbp a1. *Immunity*, 23(2):177–189, Aug 2005.
- [117] Konrad Pazdrak, Barbara Olszewska-Pazdrak, Tianshuang Liu, Ryuta Takizawa, Allan R Brasier, Roberto P Garofalo, and Antonella Casola. Mapk activation is involved in posttranscriptional regulation of rsv-induced rantes gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283(2):L364–L372, Aug 2002.
- [118] T. Koga, E. Sardiña, R. M. Tidwell, M. Pelletier, D. C. Look, and M. J. Holtzman. Virus-inducible expression of a host chemokine gene relies on replication-linked mrna stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(10):5680–5685, May 1999.
- [119] Yoshihiro Komatsu, Hiroshi Shibuya, Naoki Takeda, Jun Ninomiya-Tsuji, Teruhito Yasui, Kenji Miyado, Tomohisa Sekimoto, Naoto Ueno, Kunihiro Matsumoto, and Gen Yamada. Targeted disruption of the tab1 gene causes embryonic lethality and defects in cardiovascular and lung morphogenesis. *Mech Dev*, 119(2):239–249, Dec 2002.
- [120] Yong Liang Zhang and Chen Dong. Map kinases in immune responses. *Cell Mol Immunol*, 2(1):20–27, Feb 2005.
- [121] Nadav Askari, Jonah Beenstock, Oded Livnah, and David Engelberg. p38alpha is active in vitro and in vivo when monophosphorylated at threonine 180. *Biochemistry*, 48(11):2497–2504, Mar 2009.
- [122] Olivier Bensaude. Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? how to evaluate its activity? *Transcription*, 2(3):103–108, 5 2011.
- [123] Melissa J Moore. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mrnas. *Science*, 309(5740):1514–1518, Sep 2005.

- [124] Antonella Casola, Allyne Henderson, Tianshuang Liu, Roberto P Garofalo, and Allan R Brasier. Regulation of rantes promoter activation in alveolar epithelial cells after cytokine stimulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283(6):L1280–L1290, Dec 2002.
- [125] Sahar Saad-El-Din Bessa, Gehan Hassan Abo El-Magd, and Maaly Mohamed Mabrouk. Serum chemokines rantes and monocyte chemoattractant protein-1 in egyptian patients with atopic asthma: relationship to disease severity. *Arch Med Res*, 43(1):36–41, Jan 2012.
- [126] Huan Liu, Huan Ning, Hongchao Men, Rong Hou, Mingui Fu, Hailin Zhang, and Jianguo Liu. Regulation of ccl5 expression in smooth muscle cells following arterial injury. *PLoS One*, 7(1):e30873, 2012.
- [127] Masaya Tanno, Rekha Bassi, Diana A Gorog, Adrian T Saurin, Jie Jiang, Richard J Heads, Jody L Martin, Roger J Davis, Richard A Flavell, and Michael S Marber. Diverse mechanisms of myocardial p38 mitogen-activated protein kinase activation: evidence for mkk-independent activation by a tab1-associated mechanism contributing to injury during myocardial ischemia. *Circ Res*, 93(3):254–261, Aug 2003.
- [128] K. Kujime, S. Hashimoto, Y. Gon, K. Shimizu, and T. Horie. p38 mitogen-activated protein kinase and c-jun-nh2-terminal kinase regulate rantes production by influenza virus-infected human bronchial epithelial cells. *J Immunol*, 164(6):3222–3228, Mar 2000.

11 Publikation

Alexander Wolf, Knut Beuerlein, **Christoph Eckart**, Hendrik Weiser, Beate Dickkopf, Helmut Müller, Hiroaki Sakurai, and Michael Kracht. Identification and functional characterization of novel phosphorylation sites in tak1-binding protein (tab) 1. *PLoS One*, 6(12):e29256, 2011.

Identification and Functional Characterization of Novel Phosphorylation Sites in TAK1-Binding Protein (TAB) 1

Alexander Wolf¹, Knut Beuerlein¹, Christoph Eckart¹, Hendrik Weiser¹, Beate Dickkopf¹, Helmut Müller¹, Hiroaki Sakurai², Michael Kracht^{1*}

1 Rudolf-Buchheim-Institute of Pharmacology, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany, **2** Division of Pathogenic Biochemistry, Institute of Natural Medicine, University of Toyama, Toyama, Japan

Abstract

TAB1 was defined as a regulatory subunit of the protein kinase TAK1, which functions upstream in the pathways activated by interleukin (IL)-1, tumor necrosis factor (TNF), toll-like receptors (TLRs) and stressors. However, TAB1 also functions in the p38 MAPK pathway downstream of TAK1. We identified amino acids (aa) 452/453 and 456/457 of TAB1 as novel sites phosphorylated by TAK1 as well as by p38 MAPK in intact cells as well as *in vitro*. Serines 452/453 and 456/457 were phosphorylated upon phosphatase blockade by calyculin A, or in response to IL-1 or translational stressors such as anisomycin and sorbitol. Deletion or phospho-mimetic mutations of aa 452–457 of TAB1 retain TAB1 and p38 MAPK in the cytoplasm. The TAB1 mutant lacking aa 452–457 decreases TAB1-dependent phosphorylation of p38 MAPK. It also enhances TAB1-dependent CCL5 secretion in response to IL-1 and increases activity of a post-transcriptional reporter gene, which contains the CCL5 3' untranslated region. These data suggest a complex role of aa 452–457 of TAB1 in controlling p38 MAPK activity and subcellular localization and implicate these residues in TAK1- or p38 MAPK-dependent post-transcriptional control of gene expression.

Citation: Wolf A, Beuerlein K, Eckart C, Weiser H, Dickkopf B, et al. (2011) Identification and Functional Characterization of Novel Phosphorylation Sites in TAK1-Binding Protein (TAB) 1. PLoS ONE 6(12): e29256. doi:10.1371/journal.pone.0029256

Editor: Waldemar Debinski, Wake Forest University, School of Medicine, United States of America

Received: October 11, 2011; **Accepted:** November 23, 2011; **Published:** December 22, 2011

Copyright: © 2011 Wolf et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft Kr1143/5-3, Kr1143/7-1 and TRR81/B2 (to Dr. Kracht). Work from Dr. Kracht was further supported by the Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System (ECCPS), and the LOEWE/UGMLC program. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Michael.Kracht@pharma.med.uni-giessen.de

Introduction

A complex interplay of protein kinases and their phosphorylated substrates regulates major aspects of immune and stress responses [1]. One of these kinases is TGF β -activated protein kinase (TAK)-1 which is activated by proinflammatory cytokines (IL-1, TNF, IL-18), pathogens, RANKL, stresses and during T- and B-cell activation and thus represents a prototypic central effector acting upstream of NF- κ B, JNK and p38 MAPK signaling pathways [2–6].

TAK1 activation is tightly controlled by reversible phosphorylations, non-degradative ubiquitination and by protein:protein interactions. The latter include interactions with TAK1-binding proteins (TAB) 1–3 which all have been shown to participate in TAK1 activation. Hence, TAB1–3 can be viewed as crucial regulatory subunits of the active TAK1 kinase complex [7–12]. In TAB2 and TAB3, C-terminal Zn-finger motifs provide a docking surface for K63-linked ubiquitin chains which are conjugated by E3-ligases such as TRAF6 or TRAF2 to various signaling intermediates after activation by innate immune receptors. These covalently attached ubiquitin-chains recruit TAK1 in complex with TAB2 or TAB3 to IL-1, TNF or TLR receptors [13,14].

The TAB1 subunit is also present in TAK1/TAB2-polyubiquitinated immunoprecipitated protein complexes after IL-1 stimulation [8,15]. However, unlike TAB2 or TAB3 it apparently does not serve to direct TAK1 to receptors of the immune response [10]. Instead, a regulatory domain contained in amino acids 437–

504 of TAB1 binds to TAK1 and is fully sufficient to activate ectopically expressed TAK1 suggesting that the primary role of TAB1 is the regulation of TAK1 catalytic activity [16–19].

In addition to TAK1, TAB1 interacts with p38 MAPK and activates its autophosphorylation by an allosteric mechanism. TAB1-mediated p38 MAPK autoactivation occurs independent from all three p38 MAPK-activating kinases (MKK3, MKK6, MKK4) but accounts for only a small portion of overall p38 MAPK activity in a cell- and stimulus-dependent manner [20–24].

As illustrated in the upper panel of Fig. 1A, three functional domains in TAB1 have been defined resembling the aforementioned TAK1 C-terminal activation domain [16,17], a p38 MAPK interaction domain [22,24] and a pseudophosphatase domain [25].

By mass spectrometry and by phospho-site specific antibodies, TAB1 was shown to be phosphorylated at S423, T431 and S438 by ERK1, p38 MAPK or JNK [20,26]. Inhibition of these kinases [20,26] or ectopic expression of a dominant negative TAB1 ST423/431AA mutant [6] revealed a role of these residues in controlling TAK1 enzymatic activity by a negative feedback mechanism that inhibits TAK1-activation [6,20,26]. In addition, inactivation of TAK1 can result from dephosphorylation by the serine/threonine phosphatases PP2C, PP6 and calcineurin [27–29] or from inhibition by bacterial virulence factors such as YopP [15]. All these observations point to a complex but only partially understood array of regulatory mechanisms that shapes the functions of the TAB1–3 proteins in the TAK1 and p38 MAPK pathways.

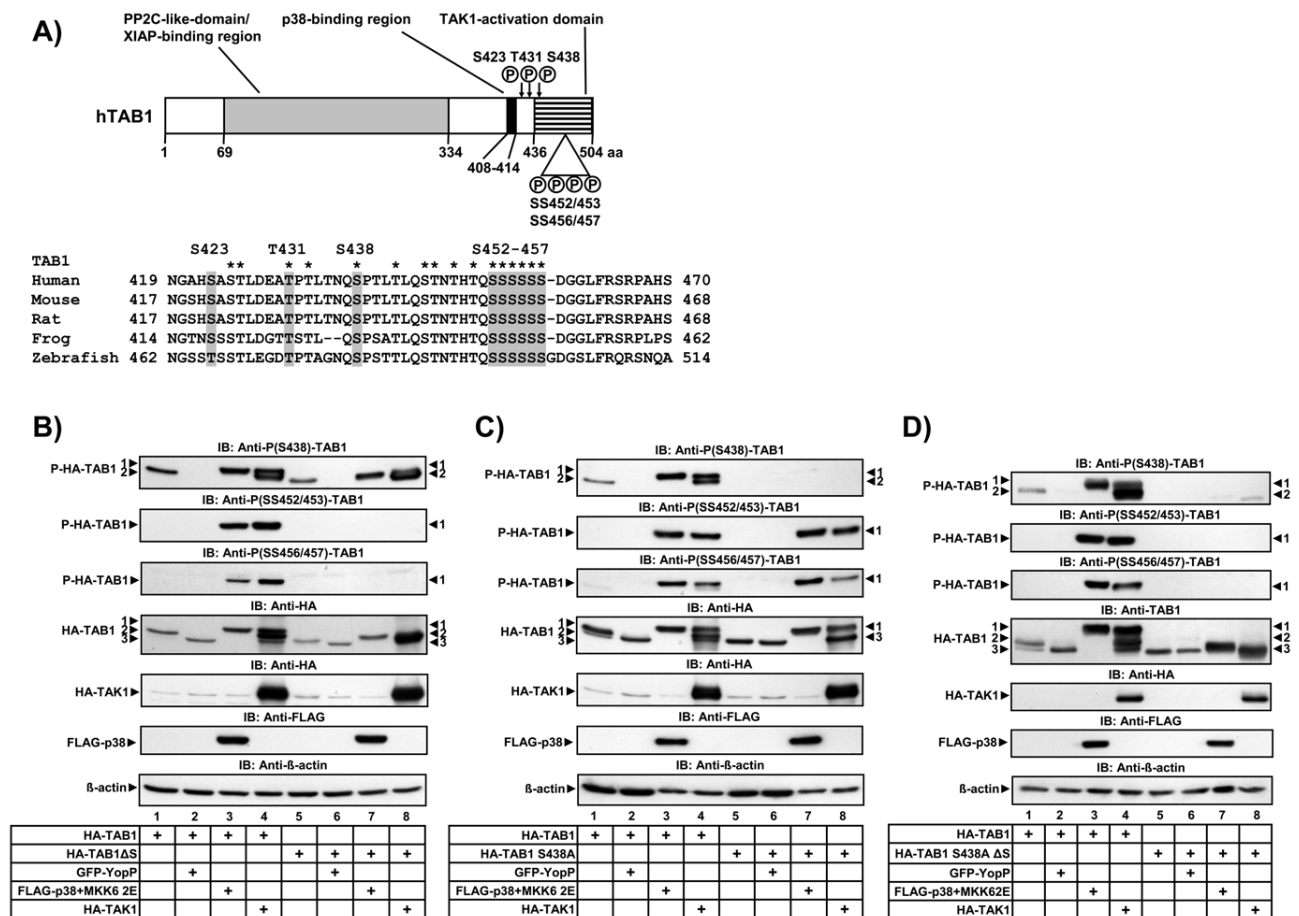


Figure 1. Identification of new phosphorylation sites in TAB1. A) Upper panel: schematic structure of TAB1 indicating functional domains and known phosphorylation sites (S423, T431, S438) as well as the new sites described in this study (SS452/453, SS456/457). Lower panel: alignment of part of the TAK1 activation domain of TAB1. Conserved potential phosphorylation sites are indicated by asterisks, phospho amino acids analyzed in this study are shaded gray. B)–D) HEK293IL-1R cells were transiently transfected with expression vectors for HA-TAB1 wild type or versions in which S438 was mutated to alanine and/or aa 452–457 were deleted (TAB1ΔS) alone or in combination with GFP-YopP, FLAG-p38 MAPK plus MKK62E or HA-TAK1 as indicated. 24 h later cells were lysed followed by immunoblotting (IB) to detect HA-TAK1, FLAG-p38 MAPK or HA-TAB1 antigens and the phosphorylated forms of TAB1 using the indicated antibodies. Equal loading of lanes was confirmed using anti β-actin antibodies. Black arrowheads indicate the three forms of TAB1 (numbered 1–3) with different mobility upon SDS-PAGE as previously described by us [15]. doi:10.1371/journal.pone.0029256.g001

In particular, the physiological role of TAB1 is still enigmatic. While ablation in mice or RNAi-mediated suppression of TAB1 has no effect on IL-1, TNF, or TLR-induced activation of NF-κB, JNK, or p38 MAPK signaling pathways, suppression of TAK1 abolishes these signals [2,3,6,26,30–33]. A recent report using reconstituted TAB1-deficient fibroblasts suggested that TAB1 functions specifically in osmotic stress-induced TAK1 and subsequent JNK activation providing first evidence for a highly selective function of TAB1 in TAK1-signaling [34].

In previous experiments aimed at investigating the effects of activated p38 MAPK or TAK1 on TAB1 we have described three different posttranslationally modified forms of TAB1 that can be distinguished based on mobility shifts upon SDS-PAGE [15]. Here, we report the identification of novel TAK1- and p38 MAPK-mediated phosphorylation sites underlying these shifts. We also present evidence suggesting that the serine cluster containing these phosphorylation sites in TAB1 is involved in regulation of TAB1 and p38 MAPK subcellular localization and affects post-transcriptional gene expression.

Results

Identification of novel phosphorylation sites in TAB1 at amino acids 452/453 and 456/457

In addition to the already described S423, T431 and S438 residues, the C-terminal part of TAB1 contains several conserved serine/threonine residues which may also be subject to regulatory phosphorylations (Fig. 1A, lower panel). Initial experiments using mutated TAB1 versions revealed that the major TAK1- or p38 MAPK-inducible shifts of TAB1 occurred independent of S423/T431/S438 (Fig. S1A). As exemplified for S425, individual mutation of some of the other conserved sites in the C-terminal part of TAB1 had no effects on TAB1 mobility shifts (Fig. S1B, compare lanes 5–8 with lanes 1–4).

In contrast, deletion of six serines comprising aa 452–457 (TAB1ΔS) abolished TAB1 form 1 in response to both, overexpressed MKK62E/p38 MAPK (Fig. 1B, lane 7) or overexpressed TAB1/TAK1 (Fig. 1B, lane 8) despite normal phosphorylation of S438 as assessed by a phospho-specific antibody (Fig. 1B). Of note,

under these activated conditions, the deletion mutant TAB1 Δ S migrated faster and mainly occurred as mobility form 2 (Fig. 1B, lanes 7, 8). As previously published by our group [15], YopP (Fig. 1B, lane 6) shifted TAB1 Δ S further downwards to form 3 which is explained by YopP affecting both, phosphorylation of aa 452–457 as well as the previously characterized p38 MAPK site S438.

In order to identify which of the six serines were phosphorylated, we generated phospho-specific antibodies against di-phosphorylated peptides containing either SS452/453 or SS456/457. A careful mutational analysis revealed the specificity of these antibodies for their respective residues (Fig. S2). As shown in Fig. 1B–D, both, activated p38 MAPK and TAK1 induced the phosphorylation at SS452/453 and SS456/457, an effect which was abolished by deleting the serine cluster of aa 452–457 in the TAB1 Δ S variant (Fig. 1B). Moreover, phosphorylation at SS452/453 or SS456/457 under these conditions was independent from mutation of the p38 MAPK site S438 (Fig. 1C). However, mutation of both, S438 and aa 452–457 abolished all major TAB1 shifts suggesting that these amino acids are the prevalent sites of TAB1 modifications in intact cells (Fig. 1D).

Using immunopurified active p38 MAPK we also found that p38 phosphorylates recombinant GST-TAB1 (Fig. 2A, B) but not a GST-TAB1 SSSS452/453/456/457AAAA mutant *in vitro* with a kinetic similar to that of the already known p38 MAPK site S438 (Fig. 2B). A similar result was obtained for activated TAK1 (Fig. 2C). These assays further established the specificity of the phospho-specific antibodies and revealed SS452/453 and SS456/457 as direct novel target sites for both, p38 MAPK and TAK1.

Phosphorylation of TAB1 at amino acids 452–457 is regulated by stress stimuli and cytokines

We then tried to identify the stimuli which regulate SS452/453 and SS456/457 phosphorylation. It has been previously noticed that activation of TAK1 by proinflammatory cytokines such as IL-1 is transient, because its catalytic activity is rapidly downregulated by serine/threonine phosphatases such as PP6 [28], PP2C isoforms [27,35,36] or calcineurin [29]. In line with the dependency of activation of the TAK1 complex on reversible phosphorylation, the strongest condition that induced phosphorylation of TAB1 at SS452/453 or SS456/457 was treatment of cells with the phosphatase inhibitor calyculin A (Fig. 3A, lane 1). SS452/453 were also phosphorylated in response to IL-1, anisomycin or sorbitol treatment, whereas detectable SS456/457 phosphorylation was only observed with anisomycin or sorbitol (Fig. 3A). In these experiments intracellular TAB1 levels were increased by overexpression of MYC-TAB1 to increase sensitivity of detection. All conditions shown in Fig. 3A also activated p38 MAPK to varying degrees which correlated with the level of TAB1 phosphorylation.

We also found that phosphorylation of endogenous TAB1 at SS452/453 could be detected by immunoprecipitating TAB1 from sorbitol-stimulated cells. This effect was suppressed by the TAK1 inhibitor 5Z-7-oxozeaenol confirming that these sites are regulated by a TAK1-dependent pathway in (patho)physiological settings (Fig. 3B). However, phosphorylation of endogenous TAB1 was only measurable when low concentrations of phosphatase inhibitors were added to the cells prior to cell lysis and by using the strongest TAK1 stimulus sorbitol suggesting that phosphorylation of TAB1 at aa 452–457 is very low abundant.

Amino acids 452–457 of TAB1 are not involved in TAK1 activation

Since the best defined function of TAB1 is the activation of TAK1 in a co-expression system, we transiently co-transfected

wild type TAB1 or the TAB1 Δ S mutant together with TAK1. As shown in Fig. S3, in HEK293IL-1R cells, TAB1 Δ S had no effect on *in vitro* kinase activity of immunoprecipitated TAK1:TAB1 complexes (Fig. S3A) and only very little effect on TAK1:TAB1 activation of IL-8 transcription (Fig. S3B), a gene whose expression is controlled by the TAK1 pathway [11]. Stable reconstitution of MYC-TAB1 in TAB1-deficient mouse embryonic fibroblasts partially restored *in vitro* kinase activity of immunoprecipitated TAK1 complex in response to calyculin A treatment compared to wild type cells (Fig. S3C). However, this effect was not influenced by reintroducing the S423, T431, S438 or the Δ S mutants in the TAB1-deficient background (Fig. S3C). We also tested if aa 452–457 were involved in ubiquitination of TAK1 and of TAB1 itself under conditions previously described by us [15]. However, deletion of aa 452–457 did not affect ubiquitination of either TAK1 or TAB1 (Fig. S3D). Collectively, these data suggested that aa 452–457 did not disturb correct folding of the minimal TAK1-activation domain comprising amino acids 480–504 [17] and did not play a role in TAK1 activation.

An active mutant of p38 MAPK phosphorylates TAB1 at aa 452/453 in the cytoplasm

We, therefore, tested a potential role of aa 452–457 in activation and localization of p38 MAPK based on reports of a direct interaction between p38 MAPK with TAB1 [20–22,24,37].

In contrast to Ge *et al.* [24] we were unable to activate p38 MAPK with TAB1 *in vitro* precluding an analysis of aa 452–457 on the *in vitro* kinase activity of p38 MAPK (data not shown). Therefore, we tested if TAB1 was able to affect phosphorylation of p38 MAPK in intact cells. Both, TAB1 and p38 MAPK were co-expressed and the phosphorylation state of p38 MAPK was investigated by immunoblot analysis of whole cell lysates (Fig. 4A). In agreement with Ge *et al.* [24] we found that overexpression of TAB1 increased phosphorylation of p38 MAPK. In our experiments, this occurred primarily at T180 but also at Y182 in intact cells (Fig. 4A, lane 3). This effect was reduced by co-expressing TAB1 Δ S, providing support for a TAB1-dependent activation mechanism of p38 MAPK that involves aa 452–457 (Fig. 4A, lane 4). We also tried to test the localization of TAB1 and p38 MAPK under conditions which induce strong TAB1 phosphorylation at SS452/453 or SS456/457. However, stress-related rounding up and detachment of cells under conditions of transfection of MKK62E or TAB1/TAK1, or, calyculin A or sorbitol treatment prevented microscopic analysis of TAB1 and p38 MAPK localization (data not shown) under the conditions established in the experiments shown in Fig. 1 and Fig. 3.

We, therefore, designed experiments to activate p38 MAPK by a separate strategy. Specifically, we used a p38 MAPK Y182F mutant which was shown by [38] to gain some kinase activity *in vitro* albeit to a much lower level than p38 MAPK fully phosphorylated at T180 and Y182 [38]. We applied this mutant of p38 MAPK to mimic modest activation of this pathway in the absence of any upstream trigger for analyzing p38 MAPK-specific effects on TAB1. Overexpression of wild type forms of p38 MAPK and TAB1 together resulted in increased phosphorylation of p38 MAPK as expected from the results shown in Fig. 4A. However, under this condition there was also increased phosphorylation of TAB1 at SS452/453 and SS456/457 (Fig. 4B, lane 2). The gain-of-function mutant p38 MAPK Y182F stimulated its own catalytic activity as assessed by increased autophosphorylation at T180 (Fig. 4B, lane 4). Moreover, when TAB1 was co-expressed with p38 MAPK Y182F, phosphorylation at both, SS452/453 and SS456/457 of TAB1 increased

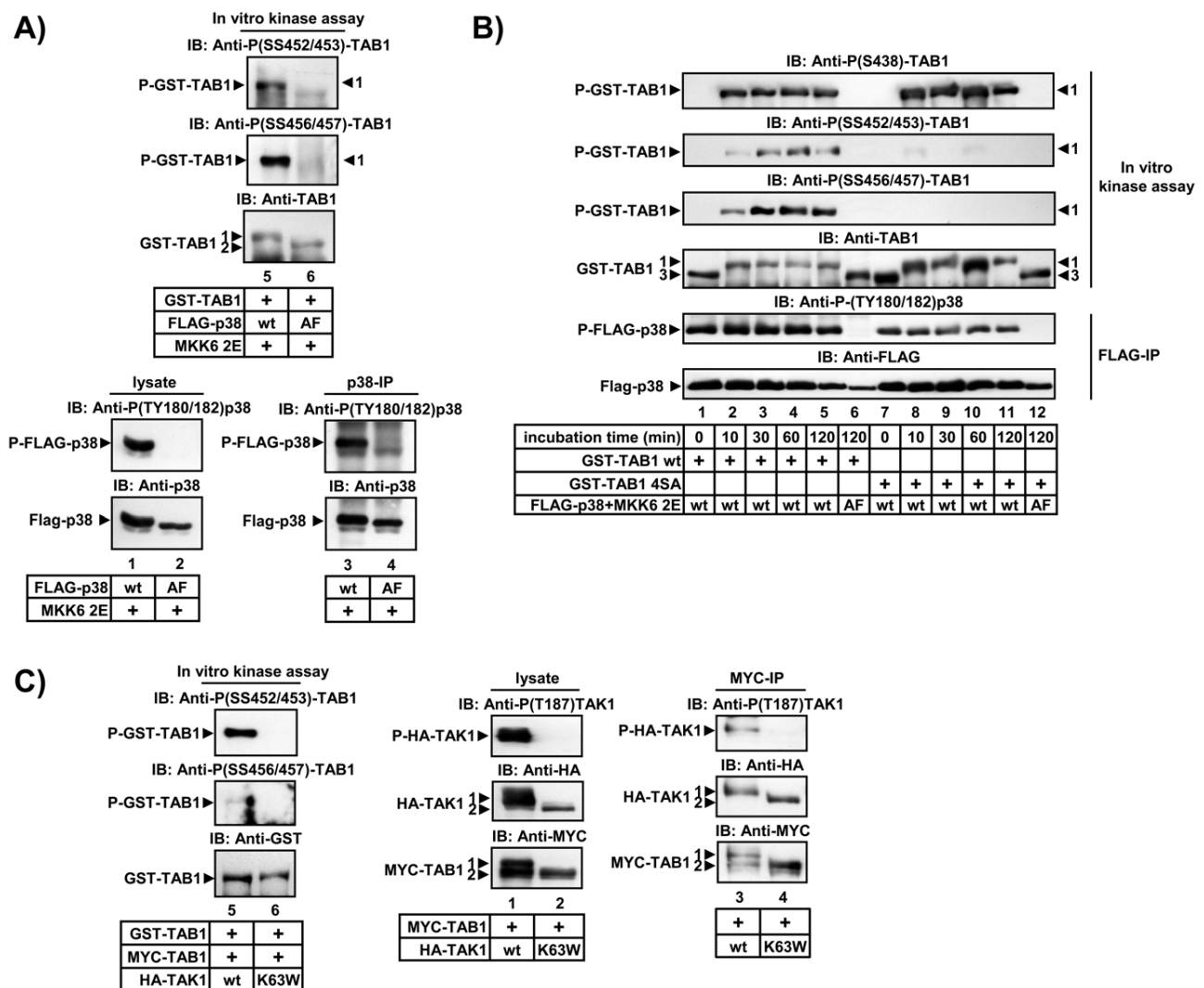


Figure 2. Active p38 MAPK and TAK1 phosphorylate SS452/453 and SS456/457 of TAB1 *in vitro*. A, B) HEK293IL-1R cells were transiently transfected with expression vectors for FLAG-p38 MAPK, inactive FLAG-p38 MAPK (T180A/Y182F, AF) or MKK62E as indicated. In C) cells were transfected with HA-TAK1, or inactive HA-TAK1 K63W plus MYC-TAB1 in the indicated combinations. 24 h later cells were lysed and used to isolate activated p38 MAPK (A, B) or TAK1 (C) by immunoprecipitation (IP). Activated p38 MAPK or TAK1 were incubated with recombinant GST-TAB1 and ATP as substrates. After 30 min, *in vitro* kinase reactions were terminated by separating GST-TAB1 with GSH-sepharose (A, C). Phosphorylation of GST-TAB1 *in vitro* was analyzed by immunoblotting using phospho-SS452/453, phospho-SS456/457 and phospho S438 specific antibodies. B) A similar experiment as in A) was performed using a GST-TAB1 SSS452/453/456/457AAAA (GST-TAB1 4SA) mutant in parallel. The assay also demonstrates the kinetic of aa 452–457 phosphorylation by p38 MAPK *in vitro*. Equal immunopurification of kinases and of recovery of GST-TAB1 was validated by immunoblotting of lysates, immunoprecipitates or GST-TAB1 purified from reaction mixtures by the indicated antibodies. Comparable amounts of inactive p38 MAPK (AF) and TAK1 (K63W) were used in parallel to demonstrate the specificity of the kinase reactions.

significantly, suggesting that active p38 MAPK is sufficient to phosphorylate these residues in intact cells (Fig. 4B, lane 4). Compared to co-expression of wild type p38 MAPK plus TAB1, co-expression of the active p38 MAPK Y182F mutant resulted in a primarily cytosolic localization of MYC-tagged TAB1 (Fig. 4C, columns 2 and 3). Moreover, p38 MAPK Y182F significantly increased TAB1 phosphorylation in the cytoplasm (Fig. 4C, column 3). This result suggests that phosphorylation of aa 452–457 of TAB1 is a means to promote cytosolic localization of TAB1. Collectively, the results shown in Fig. 4A to Fig. 4C suggest that aa 452–457 are engaged in TAB1-dependent activation of p38 MAPK but are also direct targets of p38 MAPK as schematically shown in Fig. 4D.

Deletion of amino acids 452–457 and phospho-mimetic mutants of TAB1 target TAB1 and p38 MAPK to the cytoplasm

To further reveal the role of aa 452–457 in p38 MAPK signaling, we analyzed the effects of deletion (TAB1ΔS), and phosphomimetic (TAB1 4SE) or phosphorylation-deficient (TAB1 4SA) mutants on both, p38 MAPK and TAB1 localization. In agreement with [39] we found in HEK293IL-1R cells that the majority of FLAG-p38 MAPK is localized in the nucleus of transfected cells (Fig. 5B, 2nd column). This effect is not changed by co-expressed wild type MYC-TAB1 (Fig. 5B, 3rd column). However, co-expression of TAB1ΔS or TAB1 4SE but not of a TAB1 4SA mutant resulted in an almost complete cytosolic re-

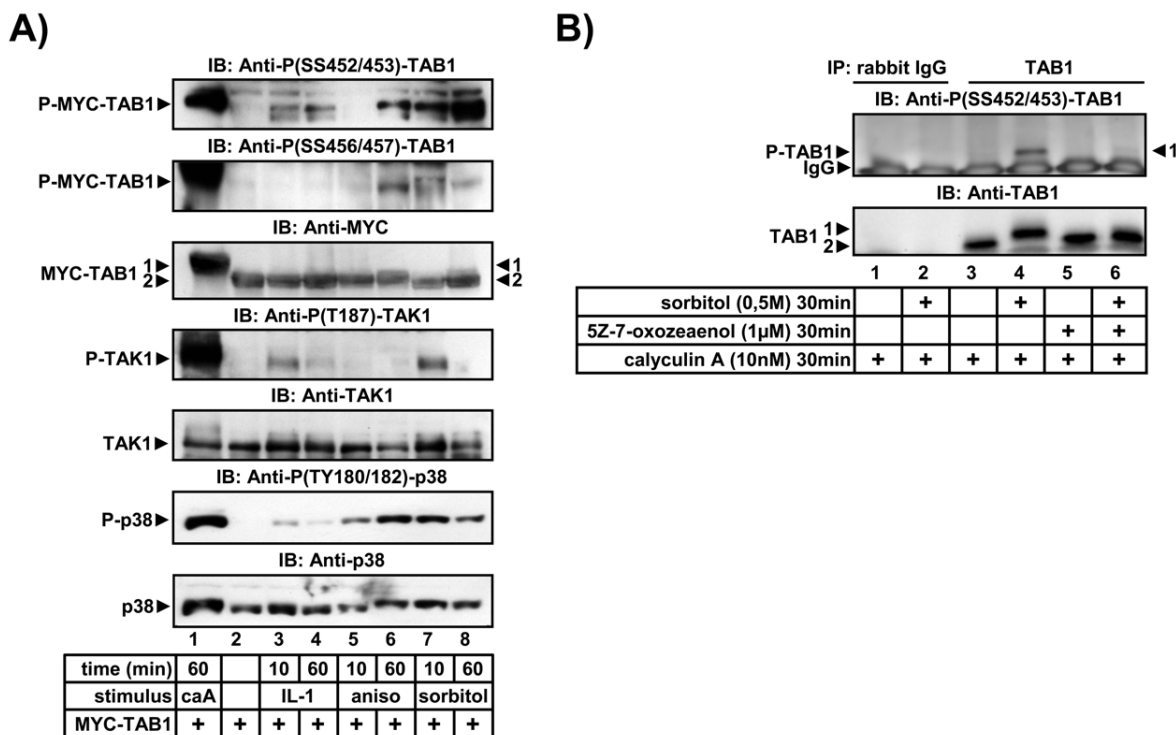


Figure 3. Phosphorylation of TAB1 at SS452/453 or SS456/457 in response to IL-1 or stress-stimuli. A) HEK293IL-1R cells were transiently transfected with an expression vector for MYC-TAB1. 24 h later, cells were treated with 40 nM calyculin A, 10 ng/ml IL-1 α , 10 μ g/ml anisomycin or 0.5 M sorbitol for the indicated times or were left untreated. Lysates were subjected to immunoblotting (IB) to detect phosphorylation of TAB1 using phospho-SS452/453-TAB1 or phospho-SS456/457-TAB1-specific antibodies. Phosphorylation of p38 MAPK at T180/Y182 and of TAK1 at T187 and equal loading of MYC-TAB1, TAK1 and p38 MAPK were analyzed using the indicated antibodies. B) HEK293IL-1R cells were treated for 30 min with 10 nM calyculin A in all samples and with the TAK1 inhibitor 5Z-7-oxozeaenol (1 μ M) as indicated followed by sorbitol (0.5 M) for 30 min, by sorbitol alone or were left untreated. Thereafter, cells were lysed, proteins were immunoprecipitated with anti-TAB1 or control (IgG) antibodies and TAB1 or phospho-TAB1 were detected by the indicated antibodies. doi:10.1371/journal.pone.0029256.g003

localization of both, p38 MAPK and TAB1 (Fig. 4B, 4th to 6th column). These results suggested that the serine cluster or its phosphorylation regulate cytosolic retention of TAB1 and of p38 MAPK.

Collectively, the results shown in Fig. 4 and 5 indicate that p38 and TAB1 mutually control their subcellular localization and imply that aa 452–457 are involved in interactions of phospho-TAB1 and active p38 MAPK to control the cytoplasmic pool of both proteins.

Amino acids 452–457 of TAB1 play a role in post-transcriptional gene regulation

In order to assign additional biological functions to aa 452–457 of TAB1 we used stably reconstituted TAB1-deficient Mefs infected with retroviral expression vectors containing either untagged (Fig. 6A) or MYC-tagged (Fig. 6B) versions of TAB1 or TAB1 Δ S. In line with previous studies [30,33,34,40] we did not observe significant changes of IL-1-induced NF- κ B, JNK and p38 MAPK pathways in TAB1-deficient Mefs (data not shown). As the data presented in Fig. 4 and Fig. 5 pointed to a cytosolic function of aa 452–457 of TAB1, and TAB1 siRNA were found to effect secretion of IL-8, IL-6, MCP-1 and GM-CSF in IL-1-treated HeLa cells [40] we screened the supernatants of TAB1-deficient and of reconstituted cells for secreted cytokines by antibody arrays. As shown in Fig. 6C, IL-1-induced CCL5 secretion was impaired in the absence of TAB1 and was restored upon reconstitution.

Other IL1-induced genes such as G-CSF were unaffected by ablation of TAB1 suggesting a specific role of TAB1 in the IL-1 response. Compared to wild type TAB1, the IL-1-induced secretion of CCL5 was enhanced by approximately 30% by reconstituting cells with either untagged, or MYC-tagged versions of TAB1 Δ S as assessed by specific ELISA (Fig. 6D).

Further experiments were performed to assess at which step of gene regulation TAB1 Δ S affected CCL5 expression. As TAB1-deficient Mefs were difficult to transfect transiently we analyzed A549 cells which strongly upregulate CCL5 protein and mRNA in response to IL-1 in a TAK1-dependant manner (Fig. S4). A previously described CCL5 promoter reporter gene construct [41] did not reveal any regulation by IL-1 and showed an inhibition of basal promoter activity upon co-expression of TAB1 wild type or TAB1 Δ S (data not shown). We, therefore, fused the entire 3' untranslated region (UTR) of the CCL5 mRNA to a luciferase cDNA (Fig. 7A) to investigate post-transcriptional regulation of CCL5. Fusion of the CCL5 3' UTR decreased luciferase mRNA and activity by 2–3-fold in reporter gene assays suggesting that the CCL5 3' UTR conferred mRNA destabilization to the otherwise stable luciferase mRNA (Fig. 7B). Co-transfection of TAB1 did not alter this destabilizing effect, whereas co-transfection of TAB1 Δ S increased steady state levels of the mRNA by 2.5-fold and luciferase activity by about 1.5-fold in seven independent transfection experiments (Fig. 7C). Together with the mainly cytosolic localization of the TAB1 Δ S and TAB1 4SE mutants as

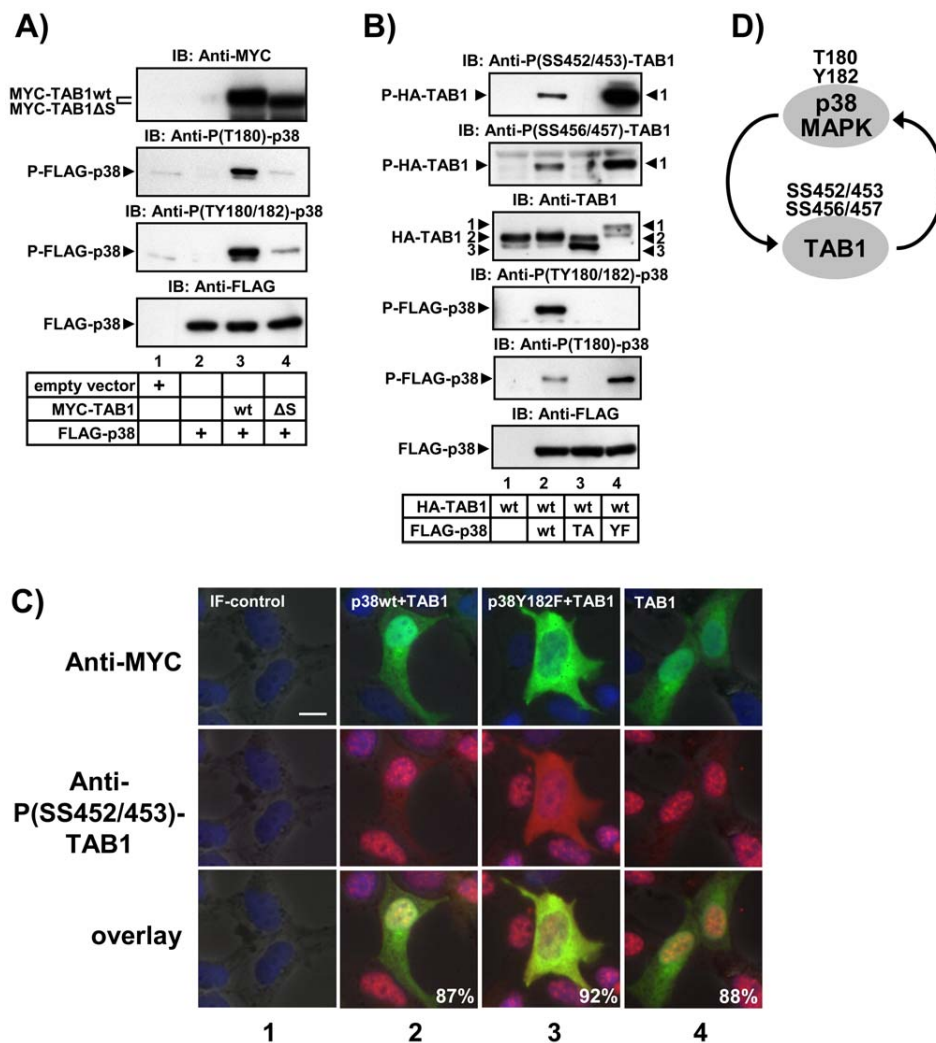


Figure 4. Amino acids 452–457 of TAB1 promote p38 MAPK phosphorylation and p38 promotes phosphorylation of TAB1. (A) HEK293L-1R cells were transiently transfected with empty vector, or FLAG-p38 MAPK alone or in combination with MYC-TAB1 wild type (wt) or MYC-TAB1 lacking aa 452–457 (ΔS). After 48 h, aliquots of lysates were analyzed by IB for phosphorylation of p38 MAPK at T180/Y182 or at T180 and for expression of the transfected proteins using MYC or FLAG antibodies. (B) HEK293L-1R cells were transiently transfected with expression vectors for HA-TAB1, FLAG-p38 MAPK wild type (wt) or versions with T180A (TA) or Y182F (YF) mutations as indicated. After 24 h aliquots of lysates were analyzed by IB for phosphorylation of TAB1 at SS452/453 and SS456/457, p38 MAPK at T180/Y182 or T180 and for expression of the transfected proteins using the indicated antibodies. (C) HEK293L-1R cells were transiently transfected with empty vector or expression vectors encoding MYC-TAB1 or FLAG-p38 MAPK wild type (wt) or the p38 MAPK Y182F (YF) mutation as indicated. After 24 h, cells were seeded for 24 h in μ -slides followed by double-immunofluorescence microscopy using anti MYC (green color) or anti phospho-TAB1 (red color) antibodies to detect TAB1 localization and phosphorylation at SS452/453. In IF-control, the primary antibodies were omitted. Nuclei were visualized by Hoechst staining (blue). Scale bar is 10 μ M. Numbers indicate percentage of transfected cells with the respective phenotype. D) Scheme indicating mutual control of TAB1 and p38 MAPK involving aa 452–457. doi:10.1371/journal.pone.0029256.g004

shown in Fig. 5 these results suggest that aa 452–457 play a role in post-transcriptional control of cytokine-responsive mRNAs such *CCL5*.

Discussion

TAB1 was the first TAK1-binding protein to be discovered [7]. TAB1 has also been implicated in an alternative allosteric activation mechanism of p38 MAPK [24]. Moreover, the protein is modified at multiple residues [20,26]. Despite these findings, as outlined above the biological role of TAB1 in the TAK1-MKK3/6-p38 MAPK pathways or in any other biological process is not well understood.

Here, we add more facets to this apparent complexity of TAB1 regulation by identifying the serine cluster surrounding aa 452–457 as new phosphorylation sites and as a new functional domain within TAB1. These sites were detected by conventional biochemical approaches and were confirmed using phospho-specific antibodies. Importantly, none of these sites were discovered by previous mass spectrometry approaches [20,42,43] underscoring that a combination of different techniques is required to reveal all possible modifications in TAB1.

TAK1 and p38 MAPK phosphorylated TAB1 at SS452/453 and SS456/457 *in vitro* and in intact cells. Physiological phosphorylation at these sites was very difficult to detect, but the available evidence suggests that a broader range of known TAK1-

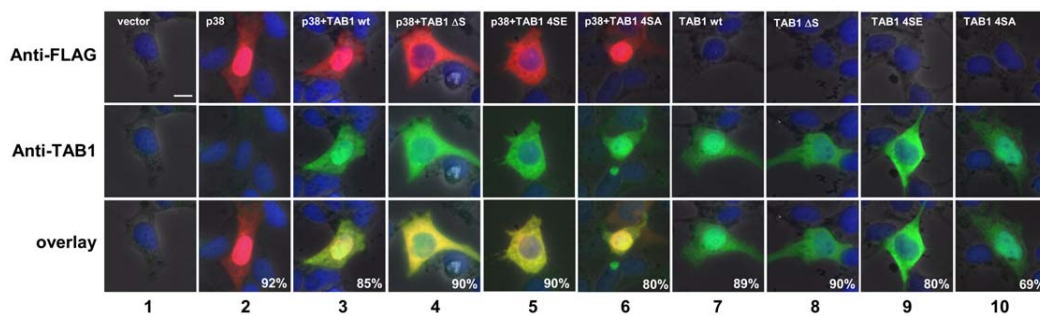


Figure 5. Mutations of aa 452–457 direct p38 MAPK and TAB1 to the cytoplasm. HEK293IL-1R cells were transiently transfected with empty vector or expression vectors for FLAG-p38 MAPK alone or in combination with MYC-TAB1 wild type (wt), MYC-TAB1 lacking aa 452–457 (Δ S), MYC-TAB1 SSSS452/453/456/457EEEE (MYC-TAB1 4SE), or MYC-TAB1 4SA. After 24 h, cells were seeded for 24 h in μ -slides followed by double-immunofluorescence microscopy using anti FLAG and anti TAB1 (H-300) antibodies to detect intracellular localization of p38 MAPK (1st row, red) or TAB1 (2nd row, green) by single or merged images (3rd row). In IF-control, the primary antibodies were omitted. Nuclei were visualized by Hoechst staining (blue). Scale bar is 10 μ M. Numbers indicate percentage of transfected cells with the respective phenotype. doi:10.1371/journal.pone.0029256.g005

and p38-activating stimuli including cytokines and translational stressors targets these sites. Moreover, the strongest inducing condition was either overexpressing active TAK1 or p38 MAPK or blocking serine/threonine phosphatases by calyculin A implying that SS452/453 and SS456/457 are tightly controlled by reversible phosphorylation events. As we did not find a significant

contribution of aa 452–457 to activation of TAK1, we focused on a putative role in p38 MAPK functions.

Experiments in transfected cells suggest that aa 452–457 played a role in cytosolic retention of both p38 MAPK and TAB1. Overexpressed p38 MAPK and its phosphorylated form is known to reside in the nucleus [39]. However, p38 MAPK localization is

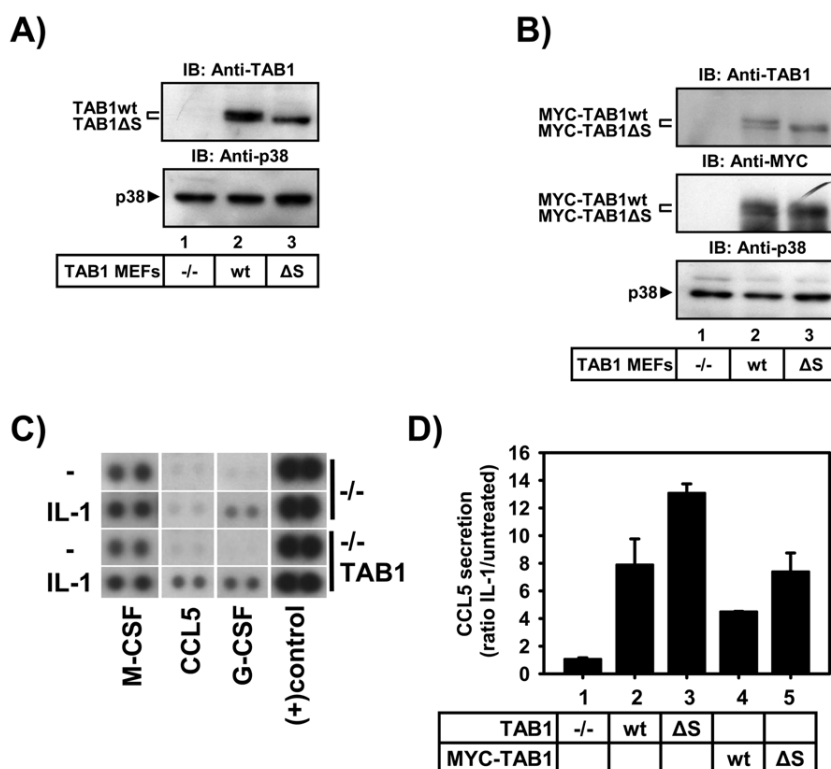


Figure 6. Amino acids 452–457 participate in modulation of TAB1-dependent CCL5 chemokine secretion in the IL-1 pathway. Murine embryonic fibroblasts were stably infected with retroviruses encoding untagged (A) or MYC-tagged (B) TAB1 wild type (wt) or TAB1 lacking aa 452–457 (Δ S). Lysates from pools of cells were analyzed for expression of the TAB1 and p38 MAPK proteins using the indicated antibodies. C) Cells from (A) were stimulated for 24 h with IL-1 α (10 ng/ml) or were left untreated. Supernatants were analyzed for secretion of cytokines by antibody arrays. Results show images of raw data obtained for two IL-1-regulated proteins (CCL5, G-CSF), one unregulated but secreted protein (M-CSF) and a positive control. D) Supernatants of cells from (A) or (B) were treated as in C) and analyzed for CCL5 secretion by ELISA. Data were normalized for protein content of cell pellets harvested in parallel. Shown are the mean ratios \pm S.E.M. of IL-1-regulated CCL5 secretion from two independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0029256.g006

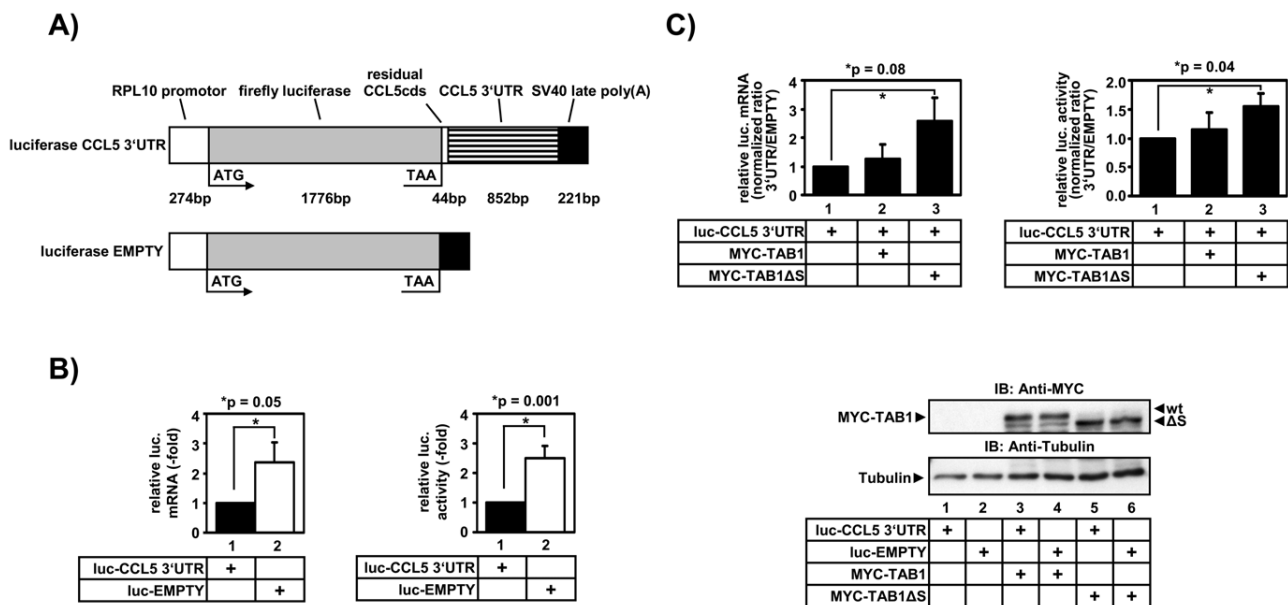


Figure 7. Amino acids 452–457 of TAB1 participate in mRNA-destabilization mediated by the *CCL5* 3' untranslated region. A) Scheme of the luciferase encoding empty control vector and the construct harboring the *CCL5* 3' UTR. B) A549 cells were transiently transfected with the control vector or the version carrying the *CCL5* 3' UTR together with SV-40-β-gal. After 24 h, cells were split into two halves, one of which was used to extract total RNA and the other was lysed for determination of luciferase activity. Luciferase mRNA was measured by RT-qPCR and luciferase activity was assessed using a chemiluminescence assay and normalized for β-galactosidase activity. Depicted is the relative mRNA expression and luciferase activity in the presence or absence of the *CCL5* 3' UTR. Data are shown as mean values \pm s.e.m. which were determined in 13 independent transfection experiments. C) Similar experiments as in B) were performed including co-expression of MYC-TAB1 wild type or MYC-TAB1ΔS. Shown is the mean ratio \pm s.e.m. of luciferase mRNA expression or activity as determined in at least seven independent transfection experiments. An increased ratio value indicates a reduced destabilizing effect of the *CCL5* 3' UTR relative to empty vector control. Lysates from transfected cells were analyzed for expression of TAB1 proteins using the indicated antibodies. Equal loading of lanes was confirmed using anti tubulin antibodies.

doi:10.1371/journal.pone.0029256.g007

highly dynamic, as p38 MAPK redistributes to the cytoplasm upon stress via the nuclear export signal of its substrate and interaction partner MK2 [39,44]. Both studies showed that the trafficking of p38 MAPK is determined by the stoichiometry of p38 MAPK:MK2 complexes [39,44]. Another study showed in rat cardiomyocytes that p38α MAPK travels not only with MK2 but also together with TAB1. Thus, TAB1 versions fused to either a cytosolically located red fluorescent protein (RFP-TAB1) or to a nuclear localization signal (NLS-TAB1) directed a GFP-p38 MAPK fusion protein towards the cytoplasm or the nucleus, respectively [37]. Our data strengthening this concept and suggest that the serine cluster of aa 452–457 is involved in nuclear targeting, as its deletion promotes a primarily cytosolic localization of TAB1 and of p38 MAPK (Fig. 5). Interestingly, the phosphomimetic mutant TAB1 4SE has the same phenotype, whereas the TAB1 4SA mutant promotes nuclear localization suggesting that in the natural TAB1 protein phosphorylation of the serine rich cluster targets TAB1 and p38 MAPK to the cytoplasm. A mechanistic explanation might be that TAB1 through aa 452–457 binds to an unknown nuclear partner protein. This interaction is relieved upon phosphorylation at aa 452–457. Released TAB1 then redistributes to the cytoplasm carrying p38 MAPK with it. In this model, lack of aa 452–457 would impair binding, whereas prevention of phosphorylation as shown by the TAB1 4SA mutant would stabilize binding to the speculative nuclear partner protein of TAB1, explaining the cytoplasmic versus nuclear localization of TAB1 ΔS and TAB1 4SA as shown in Fig. 5, respectively.

Only three partial 3-D structures of TAB1 are available, derived from crystals of either N-terminal fragments of aa 7–402 [25] or aa 1–370 [45] or from a crystal structure of a fusion protein of aa 468–504 fused to the TAK1 catalytic domain (aa 31–303) [46]. The serine cluster described in our study is not part of these structures and is also not involved in p38 MAPK binding [22]. It does neither resemble a classical basic nuclear localization signal (NLS) [47] nor a nuclear translocation signal (NTS) [48]. Hence, it apparently represents a novel regulatory domain in TAB1 which participates in fine-tuning of the p38 MAPK signaling pathway by contributing to p38 MAPK localization and autoactivation of the kinase independent from the classical MAP3K-MAP2K-MAP kinase cascades.

We also tried to validate a role of aa 452–457 in regulating p38 MAPK:TAB1 interactions by co-immunoprecipitation. However, there was little if any stable interaction of p38 MAPK with TAB1 in these assays (data not shown). This would suggest that the protein:protein interaction is either very labile or indirect. However, TAB1 promoted p38 MAPK phosphorylation primarily at T180 and the gain-of-function mutant of p38 MAPK Y182F promoted TAB1 phosphorylation at aa 452–457 adding further evidence for a mutual control of both proteins (Fig. 4).

The results presented in this study can be reconciled by the following model: in unstimulated cells, a low level of p38 MAPK activity is observed that is caused by a TAB1-dependent activation mechanism involving p38 MAPK auto-phosphorylation at T180. Conversely, TAB1 can be phosphorylated by p38 MAPK at serines 452–457 (Fig. 1, 2, 4) retaining the phosphorylated protein

primarily in the cytoplasm (Fig. 4). Normally, most TAB1 in cells is kept unphosphorylated by serine/threonine phosphatases and is found in the nucleus. Accordingly, we identified three conditions that shift this balance towards strong phosphorylation at aa 452–457 of TAB1: (i) blockade of phosphatases by calyculin A (Fig. 3), (ii) strong osmotic or translational stress (Fig. 3) and (iii) ectopic expression of TAK1, p38 MAPK plus MKK62E or the gain-of-function mutant p38 MAPK Y182F together with TAB1 (Fig. 1, 2, 4). Both, TAB1 versions lacking aa 452–457 or carrying phosphomimetic mutations trapped p38 MAPK in the cytoplasm (Fig. 5). This suggests that phosphorylated TAB1 may support post-transcriptional functions of p38 MAPK such as regulation of *CCL5* mRNA stability (Fig. 7) and secretion (Fig. 6).

Although TAK1 is another kinase that phosphorylates aa 452–457, we did not find any general effects of TAB1 mutants on overall TAK1 activation in the settings analyzed in this study. Therefore, TAB1 molecules phosphorylated at aa 452–457 by TAK1 may have unknown roles in stimulus-specific activation of TAK1 pathways.

In summary, our study suggests an intimate mutual control of p38 MAPK and its allosteric activator TAB1. Both proteins control dynamically each other's phosphorylation status, activity and subcellular localization. Our results further establish TAB1 as a multi-site phosphorylated protein and provide another piece in the puzzle of solving the function of the “enigmatic” TAB1.

In depth clarification of the underlying mechanisms will require much more extensive studies for identifying TAB1-interacting molecules that are controlled by phosphorylation of aa 452–457 and that are involved in TAB1-dependent biological functions.

Materials and Methods

Cells and materials

HEK293 cells stably expressing the IL-1 receptor (HEK293IL-1R) [15], TAB1 $-/-$ murine embryonic fibroblast lines, a kind gift of Kunihiro Matsumoto [33], and A549 lung epithelial carcinoma cells (catalogue number ACC 107, obtained from DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), complemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin. Antibodies against the following proteins or peptides were used: actin (JLA20; EMD) and TAK1 (M-579, sc-7162), TAB1 (H-300, sc-13956), GST (Z-5, sc-459), tubulin (TU-02, sc-8035), TAB2 (K-20, sc-11851), rabbit IgG (sc-2027) all from Santa Cruz, MYC (9E10), HA (12CA5), GFP (clone 7.1 and 13.1) all from Roche, FLAG M2 (F1804, Sigma), P(T180/Y182)-p38 MAPK (36–850, Invitrogen), P(T180)-p38 MAPK (02504), P(S438)-TAB1 (09519) both from Acris, TAK1 (4505), P(T187)-TAK1 (4536), TAB1 (C25E9) all from Cell signaling, p38 MAPK [49] and P(T187)-TAK1 [6]. Purified polyclonal antibodies that recognize specific phosphorylation sites in human TAB1 were raised by Eurogentec against the following peptides: TNTHTQpSpSSSSSD (SS452/3) and TQSSSpSpSDGGLF (SS456/7), where pS denotes a phosphorylated serine.

Plasmids, transfections, reporter gene assays, RT-qPCR

The expression vectors pCMV-FLAG-p38 MAPK, pCDNA3-MKK62E [50,51], pCMV-HA-TAK1, pCMV-HA-TAK1K63W, pUHC13-3-IL-8 promoter, pSV40-β-Galactosidase [11], pCDNA3-GFP-YopP, pCDNA3-GFP-TAK1, pCS2MT-MYC-TAB1, pCDNA3-HA-TAB1, pCDNA3-HA-TAB1 S438A, pCDNA3-HA-TAB1 S423/T431AA (STS/AAS), pCDNA3-HA-TAB1 S423/T431/S438AAA (STS/AAA), pDEST26-HIS-Ubiq-

uitin [15] and pGEX-GST-TAB1 [17] have been described. The following plasmids were constructed by standard cloning techniques: pCDNA3-HA-TAB1 lacking aa 452–457 (ΔS), pCDNA3-HA-TAB1 S438A ΔS, pCDNA3-HA-TAB1 S425A, pCDNA3-HA-TAB1 S452A, pCDNA3-HA-TAB1 S453A, pCDNA3-HA-TAB1 S456A, pCDNA3-HA-TAB1 S457A, pCDNA3-HA-TAB1 S452E, pCDNA3-HA-TAB1 S453E, pCDNA3-HA-TAB1 S456E, pCDNA3-HA-TAB1 S457E, pCS2MT-MYC-TAB1 ΔS, pCS2MT-MYC-TAB1 S452/3/6/7A (4SA), pCS2MT-MYC-TAB1 S452/3/6/7E (4SE), pGEX-GST-TAB1 4SA, pCMV-FLAG-p38 T180A (TA), pCMV-FLAG-p38 Y182F (YF), pCMV-FLAG-p38 T180/Y182AF (AF). Mutations were performed using the Stratagene site directed mutagenesis kit, a modification of which [52] was also used for deletion of the region encoding aa 452–457 in TAB1. pSGG-luciferase-*CCL5* 3'UTR and pSGG-luciferase-EMPTY (Fig. 7A) were purchased from switch gear genomics.

For retroviral expression, a cDNA encoding TAB1 was amplified from pCDNA3.1-HA-TAB1 [15] using the primers (se: 5'-GCGCGAATTC AATGGCGGCGCAGAGG-3'; as: 5'-GCGCCTCGAGTATCGATACTACGCTGCTGTCCACCACG-3'), cloned into pCR-Blunt II-TOPO and then subcloned into the EcoRI and XhoI sites of pCS2-MT. A ClaI fragment of pCS2-MT-MYC₆-TAB1 was then cloned into the ClaI site of pM5XNeo to generate pM5XNeo-MYC-TAB1. pM5XNeo-TAB1 was generated by excising the MYC-tags by EcoRI digestion and religation. Recombinant retroviruses and infections of Mef cells were done exactly as described in [49]. Stable cell lines were selected using 1 mg/ml G418.

Calcium phosphate transfections and reporter gene assays were performed as described [53,54].

Lipofectamine transfections of A549 cells were performed according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Lipofectamine LTX and PLUS reagents Cat. no. 15338). Specifically, A549 cells were seeded at $5-6 \times 10^5$ in 9,4 mm wells. 24 h later cells were transfected in duplicates with 2.5 µg plasmid DNA containing 0.4 µg pSV40-β-galactosidase + 0.1 µg pSGG-luciferase-*CCL5* 3'UTR or pSGG-luciferase-EMPTY in combination with 2 µg empty vector control or pCS2MT-MYC-TAB1wt or pCS2MT-MYC-TAB1ΔS and 3 µl PLUS reagent and 3.75 µl lipofectamine in DMEM per well. After 6 h at 37°C, 5% CO₂, the medium was complemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin. The next day, cells were harvested and splitted into two halves one of which was used to extract mRNA and the other was lysed for determination of luciferase activity or equal expression of the TAB1 constructs.

RT-qPCR was performed as described [54]. cDNAs were amplified using assays on demand (Applied Biosystems) for *CCL5* (Hs00171085_m1), β-actin (Hs99999903_m1) and luciferase (se: primer: 5'-GCGCAGCTTGCAAGACTATAAG-3', as-primer: 5'-TTGTGCGATGAGAGTGCTCTTAGC-3', probe: 5'-CTGGTGCCACACTAT-3').

Cell lysis and immunoprecipitations

Unless stated otherwise, cells were lysed in cell lysis buffer (50 mM TrisHCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 50 mM NaF, 1 µM Microcystin, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM sodium pyrophosphate, 0.1% β-mercaptoethanol and a Roche protease inhibitor mix). HEK293IL-1R cells (Fig. S3B) and A549 cells (Fig. 7) transfected for reporter gene assays were lysed in β-galactosidase lysis buffer as described [53].

For immunoprecipitation of p38 MAPK (Fig. 2A, 2B), cells were lysed in (10 mM Tris, pH 7.05, 30 mM NaPPi, 50 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 20 mM β-glycero-

phosphate, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, and 1 µM microcystin). p38 MAPK was immunoprecipitated from 1.5 mg cell extract protein in (1×Tris-buffered saline (TBS), 1% Triton X-100, 1 mM Na₃VO₄, 2 mM DTT, 50 mM NaF) using rabbit polyclonal anti p38 MAPK antibodies [49] (Fig. 2A) or FLAG antibodies (Fig. 2B) coupled to protein-G-Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare). Beads were washed twice in the same buffer, once in washing buffer containing (50 mM Tris, pH 7.5, 10 mM MgAc, 0.1% β-mercaptoethanol) and redissolved in 10 µl of washing buffer for *in vitro* kinase assays.

For immunoprecipitation of TAK1-TAB1 (Fig. 2C) or GFP-TAK1 (Fig. S3A), cell extracts were incubated with protein G Sepharose 4 Fast Flow coupled to 1 µg of MYC (9E10) or to 1 µg of GFP (clone 7.1 and 13.1) antibodies for 2–6 h, respectively, with gentle rocking at 4°C. Beads were then washed two times with cell lysis buffer plus 0.5 M NaCl and once with washing buffer. Beads were redissolved in 10 µl washing buffer for *in vitro* kinase assay or were splitted into two halves one of which was boiled for 5 min in 2× Roti-Load (Roth) before loading on 8% SDS-PAGE. The other half was redissolved in 10 µl washing buffer for *in vitro* kinase assay.

For immunoprecipitation of endogenous TAB1 (Fig. 3B) cells were lysed in (50 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1% Tween 20, 2.5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 10 mM β-glycerophosphate, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, Roche protease inhibitor mix, 1 mM DTT, 1 µM microcystin), sonified 3×20 seconds on ice and centrifuged at 100,000×g for 20 min at 4°C. 1.5 mg of the supernatant was used for IP with 1.5 µg of anti TAB1 (H-300) or IgG (sc-2027) antibodies coupled for 1 h to 15 µl of Trueblot anti-mouse Ig immunoprecipitation beads (e-bioscience, 00-8811-25). After 2 h, beads were washed three times in the lysis buffer including 450 mM NaCl. Proteins were eluted by boiling in 2× Roti-Load before loading on SDS-PAGE.

Immunoprecipitation of the endogenous TAK1-TAB1-TAB2 complex (Fig. S3C) using TAB2 (K-20, Santa Cruz) antibodies followed by *in vitro* kinase assay to measure TAK1 kinase activity using recombinant HIS₆-MKK6 and γ[³²P]ATP as substrates was performed as described [15].

In vitro kinase assays

Unless stated otherwise, *in vitro* kinase assays were carried out at 37°C for 30 min with agitation in 30 µl of reaction buffer containing 10 µl H₂O including approximately 1 µg of recombinant GST or HIS-tagged protein, 10 µl of redissolved protein G Sepharose beads containing kinases immunoprecipitated from cell extracts and 10 µl (100 mM Tris pH 7.5, 20 mM MgAc, 0.4–2 mM ATP, 0.2% β-mercaptoethanol). For the experiments shown in Fig. 2A, C, reaction mixtures were spun down and the supernatants (~30 µl) were incubated with glutathione Sepharose (GE Healthcare) slurry (equilibrated in cell lysis buffer) at 37°C for 30 min with agitation for purification of the recombinant GST-tagged protein. Adsorbed GST-fusion proteins were washed three times with lysis buffer. Finally, beads were boiled for 5 min in 2× Roti-Load and proteins separated by SDS-PAGE and detected by western blotting. In the experiment shown in Fig. S3A, 5 µCi γ[³²P]ATP were added to the reaction buffer and phosphorylated proteins were separated by SDS-PAGE and visualized by autoradiography.

Immunostaining and fluorescence microscopy

HEK293IL-1R cells were cultured in 9,4 mm wells. After 24 h of transfection, cells were seeded for 24 h in µ-slides VI (Ibidi). After washing, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in Hank's BSS (PAA Laboratories) for 5 min, blocked with 10%

normal donkey serum (Dianova) for 30 min and incubated with primary and secondary antibodies diluted in Hank's BSS containing 0.1% Saponin (Sigma) for 2 h at room temperature. The primary antibodies were anti-TAB1 (H-300, Santa Cruz, 1:100), anti-FLAG M2 (F1804, Sigma, 1:100), anti-MYC 9E10 (Roche, 1:200) and anti-P(SS452/3)-TAB1 (1:100). Cy3-conjugated (Chemicon, 1:200) and FITC-conjugated (Sigma, 1:100) secondary antibodies were used. For controls, primary antibodies were omitted. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (Invitrogen). Fluorescence imaging was performed on a Leica DM IRE2 fluorescence microscope. Captured images were analysed with the Leica FW4000 Fluorescence Workstation software.

Immunoblotting and ELISA

Immunoblotting was performed essentially as described [54]. Proteins were separated on 7.5–10% SDS-PAGE and electrophoretically transferred to PVDF membranes (Millipore). After blocking with 1% or 5% dried milk in Tris-HCl-buffered saline/0.05% Tween (TBST) for 1 h, membranes were incubated for 12–24 h with primary antibodies, washed in TBST and incubated for 1–2 h with the peroxidase-coupled secondary antibody. Proteins were detected by using enhanced chemiluminescence (ECL) systems from Pierce, Millipore or GE Healthcare.

Cytokine arrays and ELISA

The mouse cytokine array panel A kit (ARY006) and the mouse CCL5 duoset (DY478) were used according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Inc.).

Ubiquitination assays

Ubiquitination of TAB1 and TAK1 was determined as described in [15] with the following modifications. Briefly, one 75 cm² flask of cells were transfected with 10 µg of expression vectors for HA-TAK1, MYC-TAB1, p38 MAPK plus MKK62E (5 µg each) and 20 µg of pDest26-HIS₆-Ubiquitin or pDest26-HIS₆. Total amount of DNA was adjusted to 50 µg by adding pCDNA3.1. After 24 h cells were lysed in 1 ml of lysis buffer (6 M guanidine-HCl, 0.1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 10 mM imidazole, pH 8.0). Lysates were sonicated to shear DNA and cleared by centrifugation for 5 min at 15,000×g. 3 mg of lysate protein were incubated with 50 µl of Ni²⁺-NTA agarose for 3 h at room temperature. Beads were collected by centrifugation, washed twice in lysis buffer, twice in a buffer containing 1 volume of lysis buffer and three volumes of buffer TI (25 mM Tris pH 6.8, 20 mM imidazole, adjusted to pH 6.8), and twice with buffer TI alone. Bound proteins were eluted for 5 min at 95°C in SDS PAGE sample buffer. 120 µg of proteins from the initial lysate (input) were precipitated by adding one volume of icecold TCA (10%). The pellet was collected at 15,000×g for 15 min at 4°C, washed once in two volumes of icecold EtOH (100%), dried in a speed vac and resuspended in 100 µl of SDS PAGE sample buffer at 95°C for 5 min. Bound and input protein samples were separated by 8%SDS-PAGE including 4.5% glycerol and analysed by western blotting.

Supporting Information

Figure S1 Evidence for new phosphorylation sites in TAB1 in addition to S423, T431 and S438. A) HEK293IL-1R cells were transiently transfected with expression vectors for HA-TAB1 wild type, or versions in which S423/T431/S438 (STS) were mutated to alanine as indicated alone or in combination with GFP-YopP, FLAG-p38 MAPK plus MKK62E or HA-TAK1. B) A similar experiment as in A) was performed using a TAB1 mutant

in which S425 was mutated to alanine (HA-TAB1 S425A). 24 h later, cells were lysed followed by immunoblotting (IB) to detect HA-TAK1, FLAG-p38 MAPK or HA-TAB1 using the indicated antibodies. Black arrowheads indicate the three forms of TAB1 (numbered 1–3) with different mobility on SDS-PAGE as previously described by us [15]. Explanation: As shown in Fig. S1A, a retarded mobility form 1 of TAB1 is induced by co-expression of MKK6-p38 MAPK (Fig. S1A, lane 3) or by TAB1-activated TAK1 (Fig. S1A, lane 4). In the absence of stimulation, form 2 shows intermediate mobility and represents a constitutive form of TAB1 which is found in unstimulated cells (Fig. S1A, lane 1). Form 3 of TAB1 displays fastest mobility and is observed by either mutating S438 (Fig. S1A, lane 13) or by intracellular co-expression of the bacterial protease YopP (Fig. S1A, lane 2) which we have shown previously to inhibit the TAK1-MKK6-p38 MAPK pathway [15]. In line with this result, TAB1 form 3 is also found in cells lacking p38 α MAPK or treated with SB203580 [15], implying that S438 is constitutively phosphorylated by a low level of active p38 MAPK found in unstimulated cells. However, a version of TAB1 in which S423, T431 and S438 were mutated to alanine was still shifted by MKK6-activated p38 MAPK (Fig. S1A, lane 7) or by TAB1-activated TAK1 (Fig. S1A, lane 8) suggesting that active p38 MAPK and TAK1 phosphorylate novel sites in TAB1 in addition to the three well-characterized S423, T431 and S438 residues. (TIF)

Figure S2 Validation of phospho-specific antibodies recognizing phosphorylation of SS452/453 and SS456/457 of TAB1. HEK293IL-1R cells were transiently transfected with expression vectors for FLAG-p38 MAPK plus MKK62E (A) or HA-TAK1 (B, C) in the indicated combinations with wild type HA-TAB1 (wt) or versions in which serines 452, 453, 456, 457 were point mutated to alanine (A, B) or to glutamic acid (C). 24 h later, cells were lysed and expression of FLAG-p38 MAPK or HA-TAK1 and expression or phosphorylation of HA-TAB1 was analyzed by immunoblotting (IB) using the indicated antibodies. Black arrowheads indicate forms of TAB1 with different mobility as described in the legend of Fig. 1. D) Scheme summarizing the differential effects of MKK62E-p38 MAPK or TAK1-TAB1 on phosphorylation of individual serines in cluster of aa 452–457. Explanation: As derived from individual S-A mutations, the antibodies reacted with all phosphorylated serines and each residue could be phosphorylated by activated p38 MAPK (Fig. S2A). Likewise, overexpression of TAK1 and TAB1 caused phosphorylation of SS452/453 and SS456/457 (Fig. S2B, lane 7). However, in contrast to stimulation of phosphorylations by active p38 MAPK, mutation of S453 to alanine prevented phosphorylation at S456/457 (Fig. S2B, lane 9), while mutation of S456 to alanine significantly weakened phosphorylation at SS452/453 (Fig. S2C, lane 10). Replacing S453 or S456 by phosphomimetic glutamic acid residues restored phosphorylation of neighbouring S456 or S453 residues, respectively, in response to TAK1 (Fig. S2C, lanes 8, 9). Hence, there is a mutual influence of phosphorylations within the serine cluster of TAB1 which is only seen when TAB1 is in complex with TAK1 but not with activated p38 MAPK, although both kinases can phosphorylate all four residues in intact cells (summarized in Fig. 2D). (TIF)

References

1. Gaestel M, Kotlyarov A, Kracht M (2009) Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 8: 480–499.

Figure S3 Amino acids 452–457 play only a marginal role in TAK1 activation and in ubiquitination of the TAK1-TAB1 complex.

A) HEK293IL-1R cells were transiently transfected with GFP-TAK1 and the indicated TAB1 expression vectors. 24 h later, cells were lysed, TAK1 was immunoprecipitated using GFP antibodies and its kinase activity was determined *in vitro* using recombinant HIS₆-MKK6 and ³²P-ATP as substrates. Reaction mixtures were separated on SDS-PAGE and phosphorylated MKK6 was detected by autoradiography (left panel) as described previously [15]. TAK1 and TAB1 proteins and phosphorylated TAK1 contained in the immunoprecipitates were validated using the indicated antibodies (right panel). B) HA-TAK1 and the indicated MYC-TAB1 versions were co-transfected with IL-8 promoter luc. constructs. 24 h later, cells were lysed and luciferase activity was determined. The graph shows the mean \pm s.e.m. of the relative IL-8 promoter activity from 5 independent transfections. As shown in the lower panel for one representative experiment, lysates were analyzed in parallel for equal expression of transfected proteins. C) TAB1-deficient Mefs were stably infected with retroviruses encoding wild type TAB1 or the indicated mutants. Cells were treated for 30 min with 50 nM calyculin A as indicated or were left untreated. Lanes 8 and 9 represent samples from wild type Mefs. The TAK1 complex was immunoprecipitated using TAB2 antibodies as described in [15] and basal TAK1 activity was assessed by radioactive *in vitro* kinase assays as described in A). Lane 1 indicates a sample in which the cell extract was omitted in the kinase reaction to control for autophosphorylation of bacterially expressed HIS₆-MKK6. D) HEK293IL-1R cells were transiently transfected with empty vector or an ubiquitin expression vector (HIS-Ubiquitin) and combinations of epitope-tagged expression vectors for TAK1, TAB1, p38 MAPK and MKK62E as indicated. 24 h after transfection, cells were lysed in denaturing buffer. Ubiquitinated proteins were purified on Ni²⁺-NTA agarose. Lysates and affinity purified proteins were analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. Details are described in the methods section and in [15]. (TIF)

Figure S4 TAK1-dependent activation of the CCL5 gene in A549 cells.

A549 lung epithelial carcinoma cells were treated for 30 min with the TAK1 inhibitor 5Z-7-oxozeaenol (1 μ M) followed by IL-1 α (10 ng/ml) for 6 h, IL-1 alone or were left untreated. Thereafter, CCL5 secretion in the supernatant (A) or CCL5 mRNA expression (B) were determined by specific ELISA and RT-qPCR, respectively. Shown are mean values \pm s.e.m. form 3 independent experiments. (TIF)

Acknowledgments

We thank Kunihiro Masumoto and Tohru Ishitani for the gift of TAB1-deficient fibroblasts.

We thank Antonella Casola and Allan R. Brasier for the gift of the CCL5 promoter constructs. We thank Stefanie Vahlsing for technical assistance at the beginning of this study.

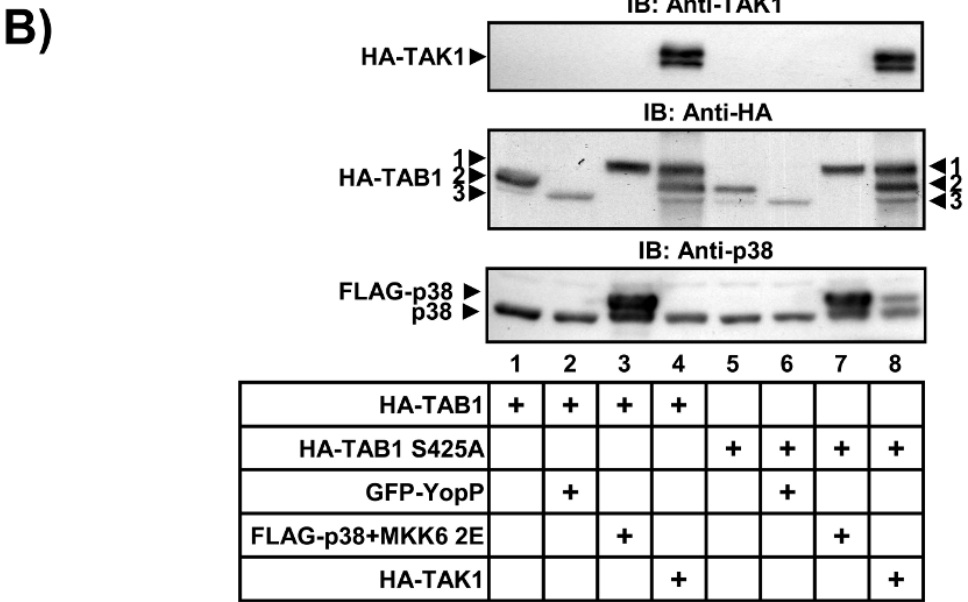
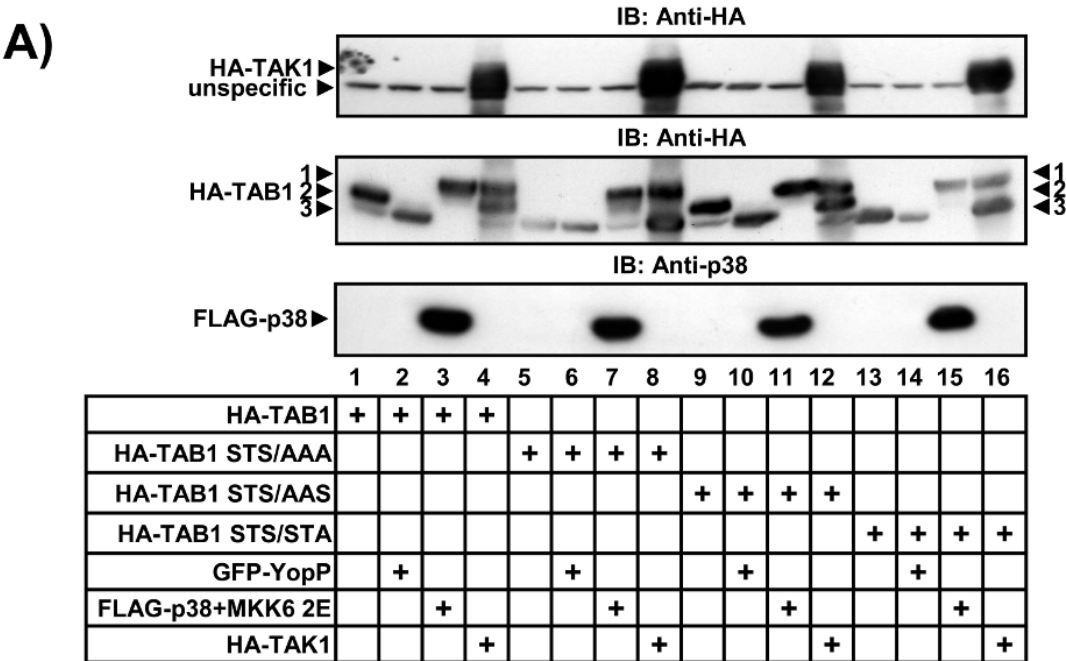
Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AW KB MK. Performed the experiments: CE HW BD HM. Analyzed the data: AW KB MK. Contributed reagents/materials/analysis tools: HS. Wrote the paper: AW KB MK.

3. Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, et al. (2005) Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6: 1087–1095.
4. Mizukami J, Takaesu G, Akatsuka H, Sakurai H, Ninomiya-Tsuji J, et al. (2002) Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol Cell Biol* 22: 992–1000.
5. Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, et al. (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398: 252–256.
6. Singhirunusorn P, Suzuki S, Kawasaki N, Saiki I, Sakurai H (2005) Critical roles of threonine 187 phosphorylation in cellular stress-induced rapid and transient activation of transforming growth factor-beta-activated kinase 1 (TAK1) in a signaling complex containing TAK1-binding protein TAB1 and TAB2. *J Biol Chem* 280: 7359–7368.
7. Shibuya H, Yamaguchi K, Shirakabe K, Tonegawa A, Gotoh Y, et al. (1996) TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* 272: 1179–1182.
8. Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, Yamaguchi K, Shibuya H, et al. (2000) TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* 5: 649–658.
9. Jin G, Klika A, Callahan M, Faga B, Danzig J, et al. (2004) Identification of a human NF-kappaB-activating protein, TAB3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2028–2033.
10. Ishitani T, Takaesu G, Ninomiya-Tsuji J, Shibuya H, Gaynor RB, et al. (2003) Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *EMBO J* 22: 6277–6288.
11. Holtmann H, Enninga J, Kalbe S, Thiefes A, Dorrie A, et al. (2001) The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation. *J Biol Chem* 276: 3508–3516.
12. Cheung PC, Nebreda AR, Cohen P (2004) TAB3, a new binding partner of the protein kinase TAK1. *Biochem J* 378: 27–34.
13. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, et al. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412: 346–351.
14. Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea CK, Hong M, et al. (2004) TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* 15: 535–548.
15. Thiefes A, Wolf A, Doerrie A, Grassl GA, Matsumoto K, et al. (2006) The Yersinia enterocolitica effector YopP inhibits host cell signalling by inactivating the protein kinase TAK1 in the IL-1 signalling pathway. *EMBO Rep* 7: 838–844.
16. Sakurai H, Nishi A, Sato N, Mizukami J, Miyoshi H, et al. (2002) TAK1-TAB1 fusion protein: a novel constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase that stimulates AP-1 and NF-kappaB signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 1277–1281.
17. Sakurai H, Miyoshi H, Mizukami J, Sugita T (2000) Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1. *FEBS Lett* 474: 141–145.
18. Kishimoto K, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J (2000) TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *J Biol Chem* 275: 7359–7364.
19. Ono K, Ohtomo T, Sato S, Sugamata Y, Suzuki M, et al. (2001) An evolutionarily conserved motif in the TAB1 C-terminal region is necessary for interaction with and activation of TAK1 MAPKKK. *J Biol Chem* 276: 24396–24400.
20. Cheung PC, Campbell DG, Nebreda AR, Cohen P (2003) Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha. *EMBO J* 22: 5793–5805.
21. Ge B, Xiong X, Jing Q, Mosley JL, Filose A, et al. (2003) TAB1beta (transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1-binding protein 1beta), a novel splicing variant of TAB1 that interacts with p38alpha but not TAK1. *J Biol Chem* 278: 2286–2293.
22. Zhou H, Zheng M, Chen J, Xie C, Kolatkar AR, et al. (2006) Determinants that control the specific interactions between TAB1 and p38alpha. *Mol Cell Biol* 26: 3824–3834.
23. Kang YJ, Seit-Nebi A, Davis RJ, Han J (2006) Multiple activation mechanisms of p38alpha mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 281: 26225–26234.
24. Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, et al. (2002) MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* 295: 1291–1294.
25. Conner SH, Kular G, Peggie M, Shepherd S, Schuttelkopf AW, et al. (2006) TAK1-binding protein 1 is a pseudophosphatase. *Biochem J* 399: 427–434.
26. Mendoza H, Campbell DG, Burness K, Hastie J, Ronkina N, et al. (2008) Roles for TAB1 in regulating the IL-1-dependent phosphorylation of the TAB3 regulatory subunit and activity of the TAK1 complex. *Biochem J* 409: 711–722.
27. Hanada M, Ninomiya-Tsuji J, Komaki K, Ohnishi M, Katsura K, et al. (2001) Regulation of the TAK1 signaling pathway by protein phosphatase 2C. *J Biol Chem* 276: 5753–5759.
28. Kajino T, Ren H, Iemura S, Natsume T, Stefansson B, et al. (2006) Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway. *J Biol Chem* 281: 39891–39896.
29. Liu Q, Busby JC, Molkentin JD (2009) Interaction between TAK1-TAB1-TAB2 and RCAN1-calcineurin defines a signalling nodal control point. *Nat Cell Biol* 11: 154–161.
30. Kettner-Buhrow D, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Wolter S, Resch K, et al. (2006) Small interfering RNAs generated by recombinant dicer induce inflammatory gene expression independent from the TAK1-NFkappaB-MAPK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 347: 566–573.
31. Takaesu G, Surabhi RM, Park KJ, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, et al. (2003) TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J Mol Biol* 326: 105–115.
32. Omori E, Matsumoto K, Sanjo H, Sato S, Akira S, et al. (2006) TAK1 is a master regulator of epidermal homeostasis involving skin inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 281: 19610–19617.
33. Shim JH, Xiao C, Paschal AE, Bailey ST, Rao P, et al. (2005) TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev* 19: 2668–2681.
34. Inagaki M, Omori E, Kim JY, Komatsu Y, Scott G, et al. (2008) TAK1-binding protein 1, TAB1, mediates osmotic stress-induced TAK1 activation but is dispensable for TAK1-mediated cytokine signaling. *J Biol Chem* 283: 33080–33086.
35. Li MG, Katsura K, Nomiyama H, Komaki K, Ninomiya-Tsuji J, et al. (2003) Regulation of the interleukin-1-induced signaling pathways by a novel member of the protein phosphatase 2C family (PP2Cepsilon). *J Biol Chem* 278: 12013–12021.
36. Baril C, Sahmi M, Ashton-Beaucage D, Stronach B, Therrien M (2009) The PP2C Alphabet Is a Negative Regulator of Stress-Activated Protein Kinase Signaling in Drosophila. *Genetics* 181: 567–579.
37. Lu G, Kang YJ, Han J, Herschman HR, Stefani E, et al. (2006) TAB-1 modulates intracellular localization of p38 MAP kinase and downstream signaling. *J Biol Chem* 281: 6087–6095.
38. Askari N, Beenstock J, Livnah O, Engelberg D (2009) p38 is Active in vitro and in vivo when Monophosphorylated on Thr180. *Biochemistry* 48: 2497–2504.
39. Ben Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ (1998) Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol* 8: 1049–1057.
40. Bertelsen M, Sanfridson A (2007) TAB1 modulates IL-1alpha mediated cytokine secretion but is dispensable for TAK1 activation. *Cell Signal* 19: 646–657.
41. Casola A, Henderson A, Liu T, Garofalo RP, Brasier AR (2002) Regulation of RANTES promoter activation in alveolar epithelial cells after cytokine stimulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L1280–L1290. 10.1152/ajplung.00162.2002 [doi]:00162.2002 [pii].
42. Prickett TD, Ninomiya-Tsuji J, Broglie P, Muratore TL, Shabanowitz J, et al. (2008) TAB4 stimulates TAK1-TAB1 phosphorylation and binds polyubiquitin to direct signaling to NF-kappa B. *J Biol Chem*.
43. Mendoza H, Campbell DG, Burness K, Hastie J, Ronkina N, et al. (2008) Roles for TAB1 in regulating the IL-1-dependent phosphorylation of the TAB3 regulatory subunit and activity of the TAK1 complex. *Biochem J* 409: 711–722.
44. Engel K, Kotlyarov A, Gaestel M (1998) Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J* 17: 3363–3371.
45. Lu M, Lin SC, Huang Y, Kang YJ, Rich R, et al. (2007) XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Mol Cell* 26: 689–702.
46. Brown K, Vial SC, Dedi N, Long JM, Dunster NJ, et al. (2005) Structural basis for the interaction of TAK1 kinase with its activating protein TAB1. *J Mol Biol* 354: 1013–1020.
47. Dingwall C, Laskey RA (1998) Nuclear import: a tale of two sites. *Curr Biol* 8: R922–R924.
48. Chuderland D, Konson A, Seger R (2008) Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Mol Cell* 31: 850–861.
49. Thiefes A, Wolter S, Mushinski JF, Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, et al. (2005) Simultaneous blockade of NFkappaB, JNK, and p38 MAPK by a kinase-inactive mutant of the protein kinase TAK1 sensitizes cells to apoptosis and affects a distinct spectrum of tumor necrosis target genes. *J Biol Chem* 280: 27728–27741.
50. Holtmann H, Winzen R, Holland P, Eickemeier S, Hoffmann E, et al. (1999) Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 19: 6742–6753.
51. Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CY, et al. (1999) The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J* 18: 4969–4980.
52. Makarova O, Kamberov E, Margolis B (2000) Generation of deletion and point mutations with one primer in a single cloning step. *Biotechniques* 29: 970–972.
53. Hoffmann E, Thiefes A, Buhrow D, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, et al. (2005) MEK1-dependent delayed expression of Fos-related antigen-1 counteracts c-Fos and p65 NF-kappaB-mediated interleukin-8 transcription in response to cytokines or growth factors. *J Biol Chem* 280: 9706–9718.
54. Rzecczkowski K, Beuerlein K, Muller H, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, et al. (2011) c-Jun N-terminal kinase phosphorylates DCPIa to control formation of P bodies. *J Cell Biol* 194: 581–596.

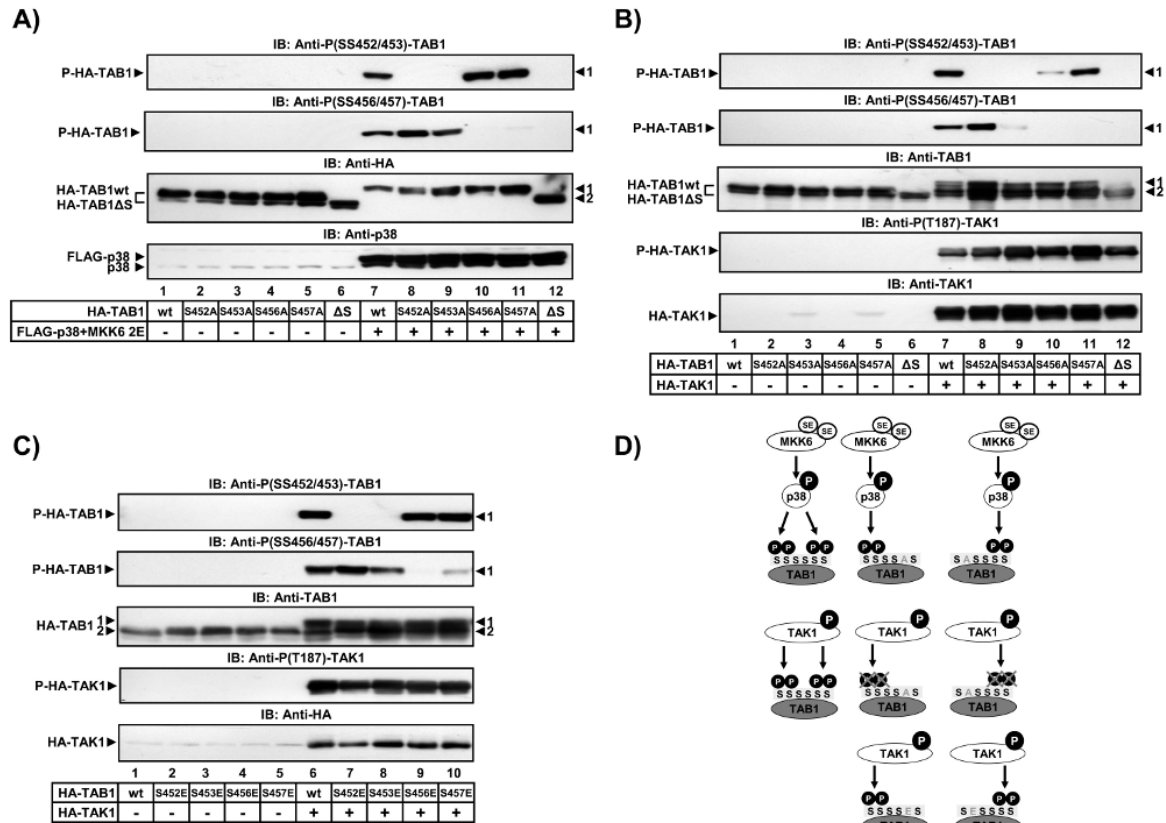
Supporting Information

Wolf et al., Fig.S1



Evidence for new phosphorylation sites in TAB1 in addition to S423, T431 and S438.

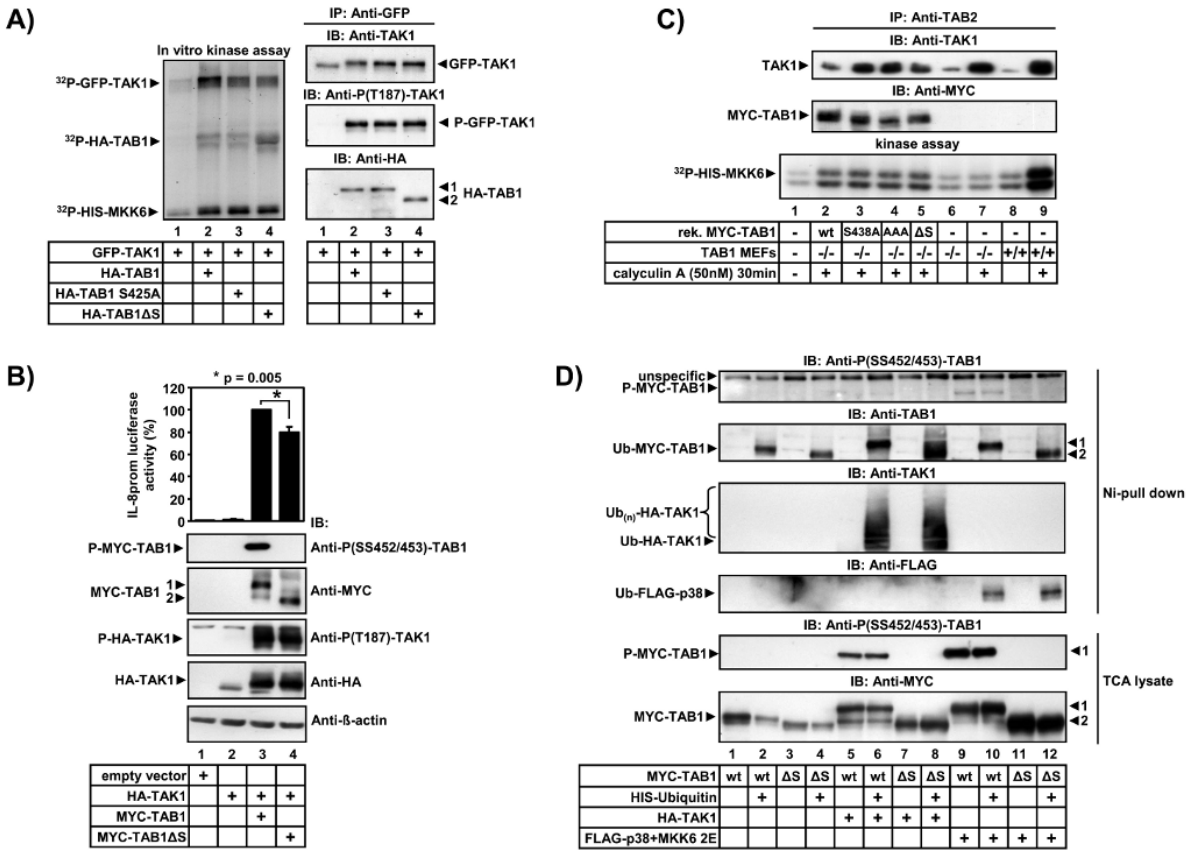
A) HEK293IL-1R cells were transiently transfected with expression vectors for HA-TAB1 wild type, or versions in which S423/T431/S438 (STS) were mutated to alanine as indicated alone or in combination with GFP-YopP, FLAG-p38 MAPK plus MKK62E or HA-TAK1. B) A similar experiment as in A) was performed using a TAB1 mutant in which S425 was mutated to alanine (HA-TAB1 S425A). 24 h later, cells were lysed followed by immunoblotting (IB) to detect HA-TAK1, FLAG-p38 MAPK or HA-TAB1 using the indicated antibodies. Black arrowheads indicate the three forms of TAB1 (numbered 1–3) with different mobility on SDS-PAGE as previously described by us [15]. Explanation: As shown in Fig. S1A, a retarded mobility form 1 of TAB1 is induced by co-expression of MKK6-p38 MAPK (Fig. S1A, lane 3) or by TAB1-activated TAK1 (Fig. S1A, lane 4). In the absence of stimulation, form 2 shows intermediate mobility and represents a constitutive form of TAB1 which is found in unstimulated cells (Fig. S1A, lane 1). Form 3 of TAB1 displays fastest mobility and is observed by either mutating S438 (Fig. S1A, lane 13) or by intracellular co-expression of the bacterial protease YopP (Fig. S1A, lane 2) which we have shown previously to inhibit the TAK1-MKK6-p38 MAPK pathway [15]. In line with this result, TAB1 form 3 is also found in cells lacking p38 α MAPK or treated with SB203580 [15], implying that S438 is constitutively phosphorylated by a low level of active p38 MAPK found in unstimulated cells. However, a version of TAB1 in which S423, T431 and S438 were mutated to alanine was still shifted by MKK6-activated p38 MAPK (Fig. S1A, lane 7) or by TAB1-activated TAK1 (Fig. S1A, lane 8) suggesting that active p38 MAPK and TAK1 phosphorylate novel sites in TAB1 in addition to the three well-characterized S423, T431 and S438 residues.



Validation of phospho-specific antibodies recognizing phosphorylation of SS452/453 and SS456/457 of TAB1. HEK293IL-1R cells were transiently transfected with expression vectors for FLAG-p38 MAPK plus MKK62E (A) or HA-TAK1 (B, C) in the indicated combinations with wild type HA-TAB1 (wt) or versions in which serines 452, 453, 456, 457 were point mutated to alanine (A, B) or to glutamic acid (C). 24 h later, cells were lysed and expression of FLAG-p38 MAPK or HA-TAK1 and expression or phosphorylation of HA-TAB1 was analyzed by immunoblotting (IB) using the indicated antibodies. Black arrowheads indicate forms of TAB1 with different mobility as described in the legend of Fig. 1. D) Scheme summarizing the differential effects of MKK62E-p38 MAPK or TAK1-TAB1 on phosphorylation of individual serines in cluster of aa 452–457. Explanation: As derived from individual S-A mutations, the antibodies reacted with all phosphorylated serines and each residue could be phosphorylated by activated p38 MAPK (Fig. S2A). Likewise, overexpression of TAK1 and TAB1 caused phosphorylation of SS452/453 and SS456/457 (Fig. S2B, lane 7). However, in contrast to stimulation of phosphorylations by active p38 MAPK, mutation of S453 to alanine prevented phosphorylation at S456/457 (Fig. S2B, lane 9), while mutation of S456 to alanine significantly weakened phosphorylation at SS452/453 (Fig. S2C, lane 10). Replacing S453 or S456

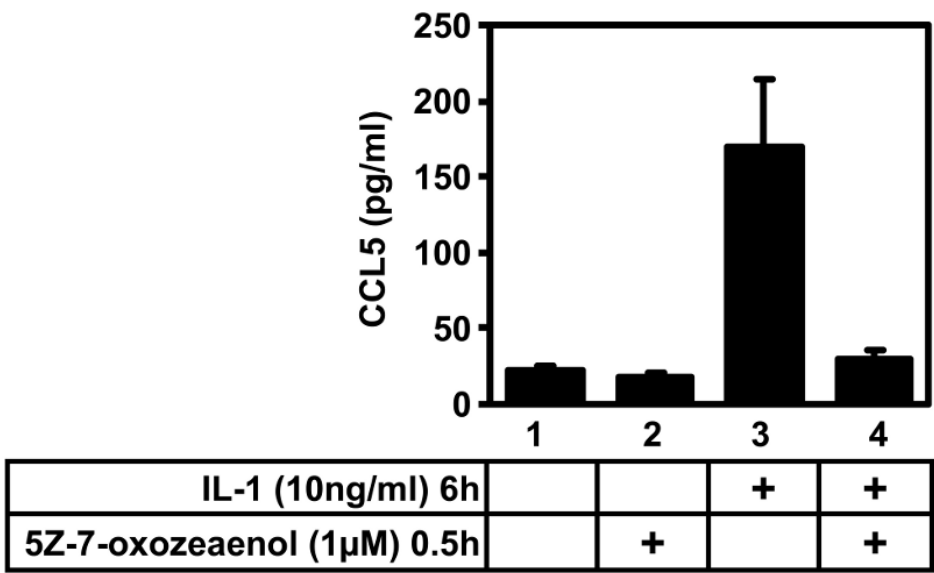
by phosphomimetic glutamic acid residues restored phosphorylation of neighbouring S456 or S453 residues, respectively, in response to TAK1 (Fig. S2C, lanes 8, 9). Hence, there is a mutual influence of phosphorylations within the serine cluster of TAB1 which is only seen when TAB1 is in complex with TAK1 but not with activated p38 MAPK, although both kinases can phosphorylate all four residues in intact cells (summarized in Fig. 2D).

Wolf et al., Fig.S3

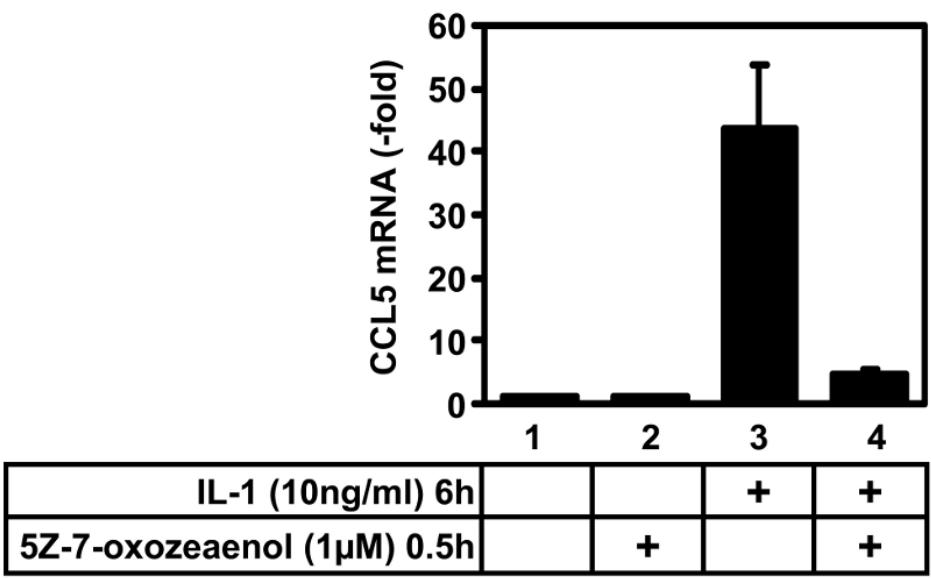


+/- s.e.m. of the relative IL-8 promoter activity from 5 independent transfections. As shown in the lower panel for one representative experiment, lysates were analyzed in parallel for equal expression of transfected proteins. C) TAB1-deficient Mefs were stably infected with retroviruses encoding wild type TAB1 or the indicated mutants. Cells were treated for 30 min with 50 nM calyculin A as indicated or were left untreated. Lanes 8 and 9 represent samples from wild type Mefs. The TAK1 complex was immunoprecipitated using TAB2 antibodies as described in [15] and basal TAK1 activity was assessed by radioactive *in vitro* kinase assays as described in A). Lane 1 indicates a sample in which the cell extract was omitted in the kinase reaction to control for autophosphorylation of bacterially expressed HIS₍₆₎-MKK6. D) HEK293IL-1R cells were transiently transfected with empty vector or an ubiquitin expression vector (HIS-Ubiquitin) and combinations of epitope-tagged expression vectors for TAK1, TAB1, p38 MAPK and MKK62E as indicated. 24 h after transfection, cells were lysed in denaturing buffer. Ubiquitinated proteins were purified on Ni²⁺-NTA agarose. Lysates and affinity purified proteins were analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. Details are described in the methods section and in [15].

A)



B)



TAK1-dependent activation of the CCL5 gene in A549 cells. A459 lung epithelial carcinoma cells were treated for 30 min with the TAK1 inhibitor 5Z-7-oxozeaenol (1 μ M) followed by IL-1 α (10 ng/ml) for 6 h, IL-1 alone or were left untreated. Thereafter, CCL5 secretion in the supernatant (A) or CCL5 mRNA expression (B) were determined by specific ELISA and RT-qPCR, respectively. Shown are mean values \pm s.e.m. from 3 independent experiments.

12 Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Alle Experimente, die in dieser Dissertation dargestellt sind, wurden von mir selbst bis auf folgende Ausnahmen durchgeführt: Durch eine Kontamination mussten Versuche wiederholt werden. Bei dieser Wiederholung wurden einige Versuche, basierend auf den von Dr. Alexander Wolf und mir etablierten Methoden, die die Abbildungen 4.7 bis 4.14 betreffen, von Dr. Alexander Wolf sowie den technischen Mitarbeiter/Innen Beate Dickopf und Hendrik Weiser durchgeführt.

Beitrag zu Wolf et al., 2011 [53]:

Mitwirkung an der Etablierung und Durchführung der Versuche einschließlich Zellkultur, transienter Transfektion, Real-Time PCR und Reportergenversuche (Fig. 7B und 7C).

Ort, Datum

Christoph Eckart

13 Danksagung

Eine Doktorarbeit stellt fortlaufend neue Herausforderungen. Alle, die mich bei der Bewältigung dieser Herausforderungen unterstützt haben danke ich herzlichst.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Kracht für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe diese Dissertation durchzuführen sowie für die Bereitstellung der Ausstattung, Geräte und Materialien.

Besonders danke ich Dr. Alexander Wolf für eine hervorragende Einarbeitung sowie anhaltende Betreuung im Labor und bei der Korrektur.

Mein weiterer Dank geht an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kracht des Rudolf-Buchheim-Institutes für Pharmakologie. Namentlich Axel, Beate, Bettina, Bianca, Prof. Dr. Brockmeier, Christiane, Daniela, Doris, Prof. Dr. Dreyer, Heike Schubert, Helmut, Hendrik, Holger, Isabelle, Johanna, Katharina, Katja, Knut, Liane, Peter, Petra und Stefanie für Ihre jederzeit freundliche und hilfsbereite Unterstützung im Labor.

Ich danke meinen Eltern, die mir das Studium der Medizin und das Verfassen dieser Doktorarbeit ermöglichten.

Ich danke Mareike für Ihre fortwährende Motivation.